

ROSENEIDE APARECIDA CONDE

*FREQÜÊNCIA DOS ALELOS DO HLA-B27 EM
PACIENTES COM ESPONDILITE ANQUILOSANTE E
CONTROLES SADIOS*

CAMPINAS

2004

ROSENEIDE APARECIDA CONDE

***FREQÜÊNCIA DOS ALELOS DO HLA-B27 EM
PACIENTES COM ESPONDILITE ANQUILOSANTE E
CONTROLES SADIOS***

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do título de Doutor em Clínica Médica,
área de Ciências Básicas*

ORIENTADOR: Prof. Dr. Manoel Barros Bértolo

CAMPINAS

2004

UNIDADE	UNICAMP
Nº CHAMADA	C751f
V	EX
TOMBO BC/	60004
PROD.	16.12.04
PREÇO	11,00
DATA	17.12.04
Nº CPD	

Biblid 331161

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

C751f Conde, Roseneide Aparecida
 Frequência dos alelos do HLA-B27 em pacientes com espondilite
 anquilosante e controles sadios / Roseneide Aparecida Conde.
 Campinas, SP : [s.n.], 2004.

 Orientador : Manoel Barros Bértolo
 Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
 de Ciências Médicas.

 1. Polimorfismo. 2. Espondiloartropatias. 3. Reumatologia. I.
 Manoel Barros Bértolo. II. Universidade Estadual de Campinas.
 Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado

Orientador(a): Prof. Dr. Manoel Barros Bertolo

Membros:

1. Prof. Dr. Paulo Lousada Junior

2. Prof. Dr. Jose Roberto Provenza

3. Prof. Dr. João Francisco Marques Neto

4. Profa. Dra. Sandra Regina Nuchinechi Fernandes

Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 31/03/2004

DEDICATÓRIA

*Dedico esse estudo a minha família, a qual devo a
minha formação como pessoa.*

AGRADECIMENTOS:

Agradeço a DEUS pela sua presença em minha vida.

“Nos momentos em que me senti fraca foram os momentos em que estive forte.”

AGRADECIMENTOS

Agradeço com todo carinho aos pacientes desta casuística que gentilmente se dispuseram a participar deste estudo.

Agradeço ao Prof. Dr. Manoel Barros Bértolo, pela confiança depositada em mim durante todos esses anos, como funcionária do laboratório de Reumatologia, e dando a oportunidade de desenvolver este trabalho como sua aluna.

Agradeço ao Dr. Percival Degrava Sampaio-Barros, pelas palavras de incentivo que recebi durante o período de desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço de forma especial a minha amiga Dirce Santiago pelas palavras de carinho e força que durante esses anos tem me oferecido.

Agradeço minha amiga Ângela Maria de Assis pela sua amizade sincera, e pelo apoio e ajuda que me ofereceu em momentos difíceis de minha vida.

Agradeço as minhas amigas: Dulcinéia Martins Albuquerque pela sua amizade e colaboração e a Helen Homa pela sua presença, sempre iluminada, não só em minha vida mas dos meus amigos (as).

Agradeço a Cecília Marly Wolke Calhelha, pelas muitas vezes que me ajudou na coleta das amostras de nossos pacientes.

Agradeço aos funcionários (as): Ademir, Eliza, Sandra de Sá, Anastácia e Eduardo (pós-graduação), pelo apoio administrativo que muitas vezes precisei para que se tornasse possível à realização deste trabalho.

Agradeço aos meus amigos (as): Aglécio, Alessandra, Anali; Andréia, Angélica, Arlete, Beatriz B., Beatriz, Breno, Claudinha, Conceição, Cristiane, Daniela, Diogo, Eduardo, Ellen, Erivan, Ester, Fernanda, Gláucia, Gustavo, Helena, Luciana, Jaqueline, Juliana, Josiane, Keila, Márcia, Patrícia, Paula, Rafael, Rosana, Ucha e Zoraída.

	<i>Pág.</i>
RESUMO	<i>xxix</i>
ABSTRACT	<i>xxxiii</i>
1 - INTRODUÇÃO	<i>37</i>
1.1 - Espondiloartropatias Soronegativas.....	<i>39</i>
1.1.1 - Espondilite Anquilosante.....	<i>41</i>
1.1.1.1 - Histórico.....	<i>41</i>
1.1.1.2 - Conceito e aspectos clínicos.....	<i>41</i>
1.1.1.3 - Diagnóstico.....	<i>43</i>
1.2 - O Sistema Antígeno Leucocitário Humano (HLA).....	<i>44</i>
1.2.1 - Localização.....	<i>44</i>
1.2.2 - Estrutura e função.....	<i>46</i>
1.3 - O Polimorfismo do antígeno HLA-B27.....	<i>48</i>
1.4 - Associação do antígeno HLA-B27 com a Espondilite Anquilosante.....	<i>53</i>
1.4.1 - Prevalência da Espondilite Anquilosante.....	<i>53</i>
1.4.2 - Hipóteses patogênicas.....	<i>54</i>
1.4.3 - Associação dos alelos.....	<i>56</i>

1.4.3.1 - Alelos associados.....	56
1.4.3.2 - Alelos associados de formas esporádicas.....	57
1.4.3.3 - Alelos não associados.....	59
2 - OBJETIVOS.....	65
3 - CASUÍSTICA.....	69
3.1 - Pacientes.....	71
3.2 - Controles.....	72
4 - METODOLOGIA.....	73
4.1 - Extração do DNA.....	75
4.1.1 - Obtenção dos leucócitos.....	75
4.1.2 - Lise dos leucócitos e precipitação do DNA.....	75
4.2 - Genotipagem dos alelos do HLA-B27.....	76
4.2.1 - Reação em cadeia da polimerase por seqüências específicas de “primers” HLA-B27 (PCR-SSP-HLA-B27) de alta resolução (FIGURA 11).....	76
4.2.2 - Detecção dos Produtos Amplificados pela PCR.....	77
4.2.3 - Análise dos resultados.....	77
4.3 - Método estatístico.....	78
5 - RESULTADOS.....	83
5.1 - Distribuição dos alelos do antígeno HLA-B27 no grupo de pacientes e controles (TABELA 8; GRÁFICO 2).....	85
5.1.1 - Pacientes.....	85

5.1.2 - Controles.....	85
5.2 - Distribuição dos alelos do antígeno HLA-B27 de acordo com a raça (TABELA 9).....	86
5.2.1 - Pacientes.....	86
5.2.2 - Controles.....	87
5.3 - Correlações dos sintomas iniciais e manifestações clínicas com as frequências dos alelos do HLA-B27 (TABELA 10 e 11).....	87
5.4 - Associações estatísticas.....	90
5.4.1 - Pacientes.....	90
5.4.1.1 - Histórico familiar de EA.....	90
5.4.2 - Controles.....	92
5.4.2.1 - Raça afro-brasileira e o alelo HLA-B*2703.....	92
5.4.2.2 - Alelos HLA-B*2703 e B*2707 no grupo controle.....	
5.5 - Padrão de Amplificação dos Alelos do HLA-B27 pela Técnica de Sequências Específicas de “Primers” (PCR-SSP) de Alta Resolução.....	93
6 - DISCUSSÃO.....	101
7 - CONCLUSÕES.....	113
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	117
9 - ANEXOS.....	133
Anexo 1 - Critérios de Diagnóstico da espondilite anquilosante.....	135
Anexo 2 - Variações nos aminoácidos dos alelos HLA-B27.....	137

LISTA DE ABREVIATURAS

EA	Espondilite anquilosante
ESN	Espondiloartropatias soronegativas
AR	Artrite reumatóide
AP	Artrite psoriásica
DII	Doença inflamatória do intestino
EI	Espondiloartropatias indiferenciadas
ARe	Artrites reativas
HLA-B27	Antígeno leucocitário humano B27
CPH	Complexo principal de histocompatibilidade
DNA	Ácido desoxirribonucléico
LTC	Linfócitos T citotóxicos
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
NH₄Cl	Cloreto de amônia
NH₄HCO₃	Bicarbonato de amônia
PCR-SSP	Reação em cadeia da polimerase por seqüências específicas de “primers”
dCTP	Citidina trifosfato
dGTP	Guanosina trifosfato
dATP	Adenosina trifosfato
dTTP	Timidina trifosfato
pb	Pares de base

LISTA DE TABELAS

	<i>Pág.</i>
Tabela 1 - Comparação entre artropatias soropositivas e soronegativas.....	40
Tabela 2 - Classificação dos alelos HLA-B27.....	52
Tabela 3 - Prevalência da Espondilite Anquilosante de acordo com a frequência do HLA-B27 em algumas populações.....	54
Tabela 4 - Distribuição dos alelos HLA-B27 de acordo com o grupo étnico predominante na população geral.....	60
Tabela 5 - Distribuição dos alelos do HLA-B27 na população normal e na EA..	61
Tabela 6 - Distribuição dos alelos do HLA-B27 na população normal e na ESN	63
Tabela 7 - Metodologia utilizada para interpretar os resultados da Reação em Cadeia da polimerase dos alelos HLA-B27.....	79
Tabela 8 - Distribuição dos alelos do antígeno HLA-B27, em pacientes e controles.....	85
Tabela 9 - Distribuição dos alelos do antígeno HLA-B27 nas raças caucasóides, afro-brasileiras e asiáticas.....	87
Tabela 10 - Frequência dos alelos do HLA-B27 de acordo com os sintomas iniciais da EA.....	88
Tabela 11 - Frequência dos alelos do HLA-B27 de acordo com as manifestações clínicas da EA.....	89
Tabela 12 - Tendência estatística observada entre o alelo B*2702 e o histórico familiar de EA, com os alelos observados no grupo de pacientes.....	90
Tabela 13 - Associação entre o alelo B*2702 com o grupo de pacientes com histórico familiar de EA.....	91

LISTA DE FIGURAS

	<i>Pág.</i>
Figura 1 - A Família das Espondiloartropatias (Adaptado: www.emedicine.com).....	40
Figura 2 - Progressão da Espondilite Anquilosante com o passar dos anos Adaptado: (www.emedicine.com).....	42
Figura 3 - Áreas do corpo onde a inflamação pode ocorrer e o valor estimado da frequência de ocorrência (em percentagem de doentes afetados). Adaptado: www.anea-sede.rcts.pt	43
Figura 4 - Cromossomo 6 (www.ncbi.nlm.nih.gov/mhc).....	45
Figura 5 - Organização genética do Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) Humano (Adaptado e modificado: JANEWAY, 2001, www.ncbi.nlm.nih.gov/books).....	45
Figura 6 - Molécula HLA-classe I Adaptado: ALBERTS <i>et al.</i> , 2002 (www.ncbi.nlm.nih.gov/books).....	47
Figura7 - Molécula HLA-classe II Adaptado: ALBERTS <i>et al.</i> , 2002 (www.ncbi.nlm.nih.gov/books).....	48
Figura 8 - Ligação do peptídeo na molécula HLA de classe I Adaptado: ALBERTS <i>et al.</i> , 2002 (www.ncbi.nlm.nih.gov/books).....	49
Figura 9 - Hipótese da evolução dos alelos HLA-B27 a partir do B*2705 Adaptado e modificado: RAMOS e LÓPEZ DE CASTRO, 2002.....	51
Figura 10 - Hipótese do peptídeo artritogênico (Adaptado e modificado: RAMOS e LOPEZ DE CASTRO, 2003).....	55

Figura 11 - Esquema da PCR-SSP HLA-B27.....	77
Figura 12 - Alelo HLA-B*2702.....	94
Figura 13 - Alelo HLA-B*2703.....	95
Figura 14 - Alelo HLA-B*2704.....	96
Figura 15 - Alelo HLA-B*2705.....	97
Figura 16 - Alelo HLA-B*2707.....	98
Figura 17 - Alelo HLA-B*2713.....	99
Figura 18 - Distribuição geográfica dos alelos do HLA-B27 prevalentes na população com EA.....	111

LISTA DE GRÁFICOS

	<i>Pág.</i>
Gráfico 1 - Número de antígenos e alelos de classe I e II identificados desde 1968 Adaptado: IMGTA/ HLA http://www.anthonynolan.com	46
Gráfico 2 - Representação gráfica da distribuição dos alelos do antígeno HLA-B27 no grupo de pacientes e controles.....	86
Gráfico 3 - Representação gráfica da distribuição dos alelos HLA-B*2702 e B*2705 com o histórico familiar de EA.....	91
Gráfico 4 - Representação gráfica da distribuição dos alelos HLA-B27 na raça caucasóide e afro-brasileira no grupo controle.....	92

RESUMO



FREQÜÊNCIA DOS ALELOS DO HLA-B27 EM PACIENTES COM ESPONDILITE ANQUILOSANTE E CONTROLES SADIOS

Até o momento, 25 alelos do HLA-B27 (HLA-B*2701-B*2724) foram identificados, e alguns desses alelos (B*2702, B*2704, B*2705 e B*2707) são claramente associados com a espondilite anquilosante. O alelo HLA-B27 mais comum na população normal e com espondilite anquilosante é o B*2705, seguido pelo B*2702, observado em populações caucasóides. Os alelos B*2704 e B*2707 são freqüentes em populações asiáticas e o alelo B*2703 em populações africanas.

O presente estudo teve como objetivo identificar e determinar a freqüência dos alelos do HLA-B27 numa população de pacientes com EA e comparar com uma população de indivíduos normais. O estudo foi conduzido em 108 pacientes classificados como EA, de acordo com o critério New York modificado, atendidos no ambulatório clínico da Unidade de Reumatologia, do Hospital das Clínicas, da Universidade Estadual de Campinas, e 111 controles normais HLA-B27 positivos, recrutados a partir de doadores de órgãos e sangue sadios ou doadores de transplante de células primárias hematopoéticas atendidos no laboratório de Imunogenética de Transplante do Departamento de Patologia Clínica da Universidade Estadual de Campinas e do laboratório de Imunologia Molecular da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto. Os alelos do HLA-B27 foram tipificados no Laboratório de Reumatologia utilizando a técnica da reação em cadeia da polimerase amplificando DNA hibridados com seqüências específicas de “primers” (PCR-SSP) de alta resolução HLA-B27 (B*2701-B*2721).

O HLA-B*2705 foi o alelo predominante, observado em 90% dos pacientes e 80% dos controles, seguido pelo HLA-B*2702, presente em 8% dos pacientes e 10% dos controles. O HLA-B*2713 foi encontrado em um paciente e um controle, ambos caucasóides; o HLA-B*2704 em um paciente japonês-brasileiro, e ausente na população-controle; os alelos HLA-B*2703 (6%) e HLA-B*2707 (3%) foram observados somente nos controles. Correlações estatísticas foram estabelecidas entre a presença dos alelos B*2703 e B*2707 e o grupo controle ($p=0.0086$), e entre os alelos B*2703 e afro-brasileiros ($p=0.028$); foi observada uma tendência estatística entre histórico familiar de EA e o alelo B*2702 ($p=0.084$), quando comparados com todos os alelos observados no grupo de pacientes,

entretanto, ao compararmos apenas os alelos detectados com histórico familiar, foi observada uma associação estatística de $p=0,035$ com relação ao alelo B*2702.

Com base nestes resultados, pudemos concluir: os alelos B*2702, B*2704, B*2705 e B*2713 estão relacionados à EA nesta amostra da população brasileira, porém, em relação ao HLA-B*2713, é necessário mais relatos para confirmar a associação deste alelo com a doença; os alelos B*2703 e B*2707 estão associados de forma negativa com a EA na amostra da população estudada; o alelo B*2703 pode estar influenciando a frequência da EA na amostra da população controle estudada; a distribuição dos alelos HLA-B27 na casuística não diferiu da maioria das populações caucasóides com EA, onde o B*2705 e B*2702 são os alelos predominantes; os resultados demonstraram que a população estudada, composta de caucasóides e afro-brasileiros, apresentou um grande polimorfismo, comparada a estudos realizados em outros países da América, como no México, Venezuela e Colômbia; o estudo confirmou que diferentes origens genéticas e geográficas podem contribuir significativamente para diferenças na distribuição dos alelos HLA-B27 na população brasileira.

ABSTRACT



FREQUENCY OF THE HLA-B27 ALLELES IN PATIENTS WITH ANKYLOSING SPONDYLITIS, AND HEALTHY CONTROLS

At moment, 25 alleles of B27 (HLA- B*2701 to B*2724) have been identified, and some of them (B*2702, B*2704, B*2705 and B*2707) are clearly associated with AS (REVEILLE *et al.*, 2001). The most common HLA-B27 allele in the healthy population and in populations with ankylosing spondylitis is the B*2705, followed by B*2702 which is a restricted allele in Caucasian population. The B*2704 and B*2707 alleles are frequent in Asiatic populations and the B*2703 allele in Africans populations.

The aim of this study was to identify the frequency of the HLA-B27 alleles in a population of Brazilian patients with AS and to compare with a population of normal individuals HLA-B27 positives. The study was carried out on 108 patients classified as AS according with the modified New York criteria who attended the outpatient clinic of the Rheumatology of Unit, the State University of Campinas and 111 HLA-B27 positive controls, retrieved from healthy blood donors and solid organ or hematopoietic stem cell transplantation donors who attended the Transplant Immunogenetic Laboratory of the Department of Clinical Pathology of the State University of Campinas and the Laboratory of Molecular Immunology of the State University of São Paulo at Ribeirão Preto. HLA-B27 alleles were typed in the Laboratory of Rheumatology using polymerase chain reaction amplified DNA hybridized with sequence specific high-resolution B27 Primers - PCR-SSP- (HLA-B*2701 to HLA-B*2721) (Dynal, Biotech Ltd., UK).

HLA-B*2705 was the most common, allele in 90% of the patients and 80% of the controls, followed by the HLA-B*2702, observed in 8% of the patients and 10% of the controls. HLA-B*2713 was found in one patient and in one control. HLA-B*2704 was identified in one patient, and it was absent in the control population. HLA-B*2703 (6%) and HLA-B*2707 (3%) alleles were observed only in the controls. Statistical correlation was established between family history of AS and the HLA-B*2702 allele ($p=0.035$), B*2703 allele and the African-Brazilians ($p=0.028$), and the presence of the B*2703 and B*2707 alleles and the control group ($p=0.0086$).

In conclusion, we found that the B*2702, B*2704, B*2705 and B*2713 alleles are related to AS in the Brazilian population but more data would be necessary regarding the B*2713 to confirm the association of this allele with the disease; the B*2703 e B*2707 alleles are associated in a negative form to AS in the sample population studied; the B*2703 allele might be influencing AS frequency in the control population studied ; the distribution of B27 alleles in the population sample did not differ from other Caucasian populations with AS in which B*2705 and B*2702 are the predominant alleles; the results demonstrated that the population study sample composed of Caucasians and African-Brazilians presented a great polymorphism compared the study realized in country the American, with the México, Venezuela e Colombia. This study confirmed that different genetic and geographical origins could contribute significantly to the differences in the distribution of the HLA-B27 alleles in the Brazilian population.

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - ESPONDILOARTROPATIAS SORONEGATIVAS

O conceito das espondiloartropatias soronegativas (ESN) engloba um conjunto de doenças inflamatórias crônicas que inclui: a espondilite anquilosante (EA) - doença mais freqüente e mais típica dentre as ESN (FIGURA 1), a artrite psoriásica (AP), a síndrome de Reiter (SR), as artrites reativas (ARe), a artrite enteropática (associada às doenças inflamatórias intestinais) e as espondiloartropatias indiferenciadas (EI). O conceito das ESN foi proposto após a observação de que este conjunto de doenças estava associado à presença do antígeno de histocompatibilidade HLA-B27 (BREWERTON *et al.*, 1973; SHOLOSTEIN *et al.*, 1973), e do reconhecimento de que os pacientes eram soronegativos para o fator reumatóide em 1974 por WRIGHT e MOLL, diferindo dessa forma das artropatias soropositivas nestes e em outros aspectos (TABELA 1). A freqüência de pacientes HLA-B27 positivos varia de 70-80% na SR, 50-60% na AP e na artrite enteropática, > 95% na EA (CALIN, 1983) e de 80-84% nas EI (OLIVIERI *et al.*, 1995). Os sítios patológicos das ESN incluem as ênteses (sítios de inserção dos ligamentos e tendões nos ossos), o esqueleto axial (incluindo as articulações sacroilíacas), as articulações periféricas e algumas estruturas extra-articulares (intestino, pele, olhos e válvula aórtica) (KHAN, 2002).

No início dos anos 90, dois critérios de classificação – Amor (AMOR *et al.*1990) e o Grupo Europeu de Estudos de Espondiloartropatias (ESSG) (DOUGADOS *et al.*1991) – foram propostos a fim de estimar a prevalência das ESN na população. Estudos recentes tem avaliado a prevalência das ESN em diferentes populações, variando entre 0,47% (SARAUX *et al.*, 1999) e 1,9% (BRAUN *et al.*, 1998).

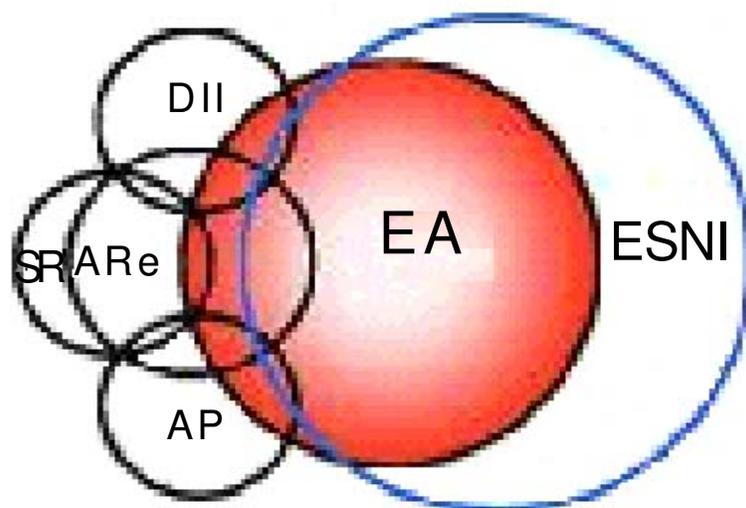


Figura 1 - A Família das Espondiloartropatias (Adaptado: www.emedicine.com)

Tabela 1 - Comparação entre Artropatias Soropositivas e Soronegativas

	Soropositivas	Soronegativas
Sexo	F>M	M>F
Fator reumatóide +	80%	<10%
Envolvimento lombar	Incomum	Comum
Entesopatias	Raro	Comum
Dactilites	Raro	Comum
Irites	Raro	Comum
Conjuntivite	Comum	Raro
Uretrites	Raro	Comum
HLA-B27	4-8%	50-95%*
Agregação familiar	Incomum	Comum

Adaptado de GLADMAN, 1998

* (CALIN, 1983; OLIVIERI *et al.*, 1995)

1.1.1 - Espondilite Anquilosante

1.1.1.1 - Histórico

Embora descrições anatômicas compatíveis com EA fossem observadas em múmias do antigo Egito (FELDTKELLER *et al.*, 2003), a primeira descrição como uma entidade patológica distinta foi realizada em 1690 por um estudante de medicina irlandês chamado Bernhard Connor (BYWATERS, 1980). A caracterização como uma entidade clínica distinta surgiu após as observações de Adolfo Strumpell na Alemanha (1884), Wladimir Von Becheterew na Rússia (1893) e Pierre Marie na França (1898) (apud TAROUG, 2002). A partir da década de 30, o advento da radiologia associou a presença de sacroileíte à EA, que por algum tempo foi chamada de “espondilite reumatóide”, por ser considerada uma variante axial da artrite reumatóide, citado por ARMAS (2001). Em 1974, conforme previamente descrito, a EA foi enquadrada no conceito das ESN.

1.1.1.2 - Conceito e aspectos clínicos

O termo espondilite anquilosante deriva das palavras gregas *ankylos* (curvatura) e *spondylos* (vértebras). Trata-se de uma doença inflamatória sistêmica crônica, de etiologia desconhecida que afeta primariamente o esqueleto axial, podendo evoluir com limitação funcional progressiva e anquilose da coluna vertebral, contribuindo para a postura de esquiador (FIGURA 2). São também observados acometimentos articulares periféricos e alguns extra-articulares. O envolvimento das regiões sacroilíacas ocorre em 100% dos pacientes afetados, enquanto as outras regiões do corpo possuem um valor estimado da frequência (FIGURA 3). Os acometimentos articulares periféricos são representados pelas oligoartrites (predominantes nas grandes articulações dos membros inferiores) e entesopatias (acometendo a inserção do tendão de Aquiles/ e ou fâscia plantar). Com relação às manifestações extra-articulares, é observada a presença de: irites, particularmente a uveíte anterior aguda, que ocorre em 25 a 40% dos pacientes; alterações cardíacas, como aortite e arritmias; pulmonares, tais como fibrose pulmonar apical e cavitação; renais, destacando-se a nefropatia pelo depósito de IgA e a amiloidose secundária; neurológicas,

que podem ocorrer devido a fraturas / deslocação das vértebras, subluxação atlanto-axial e síndrome da cauda equina; e a osteoporose da coluna, que é de natureza multifatorial, freqüentemente observada em pacientes com EA severa de longa duração e também nos estágios iniciais da doença (como resultado da liberação de citocinas pró-inflamatórias) (KHAN, 2002a; SAMPAIO-BARROS, 2004).

A EA atinge geralmente adultos jovens (segunda e quarta décadas da vida), preferencialmente do sexo masculino (numa proporção de 4 a 5:1) e caucasóide. Geralmente o sintoma inicial no adulto é a lombalgia de ritmo inflamatório, com predomínio dos sintomas axiais durante a evolução. A EA juvenil é considerada antes dos 16 anos e a artrite periférica juntamente com as entesopatias periféricas costumam ser os primeiros sintomas, que após alguns anos evoluem para a lombalgia de ritmo inflamatório (SAMPALIO-BARROS, 2004). Alguns pacientes podem ter sintomas moderados, tal como perda de apetite ou febre moderada no início da doença, sendo estes sintomas mais comuns entre pacientes com início juvenil (KHAN, 1992).

Em pacientes com EA muitas das perdas funcionais ocorrem durante os primeiros 10 anos, e se correlacionam de forma significativa com a presença de artrites periféricas, alterações radiográficas na coluna vertebral, e o desenvolvimento da “coluna em bambu”. As causas de óbito incluem doenças cardíacas, cerebrovasculares, neoplasia, insuficiência renal, e infecções, geralmente não decorrentes pela EA (GLADMAN, 1998).

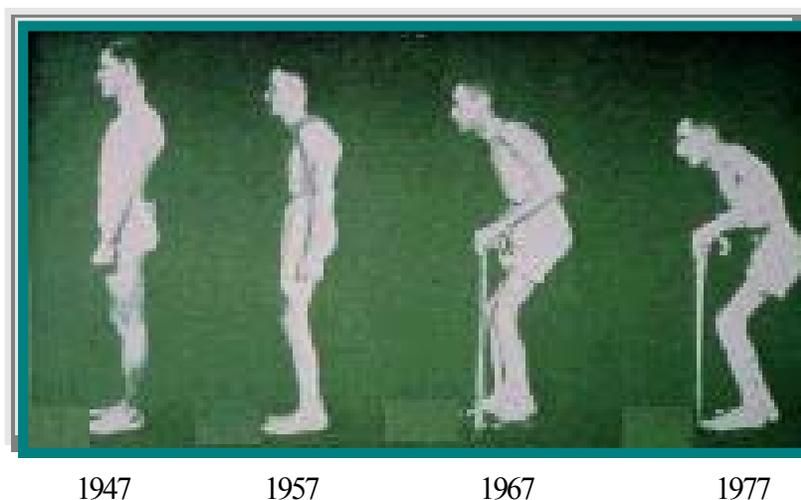


Figura 2 - Progressão da Espondilite Anquilosante com o passar dos anos

Adaptado: (www.emedicine.com)

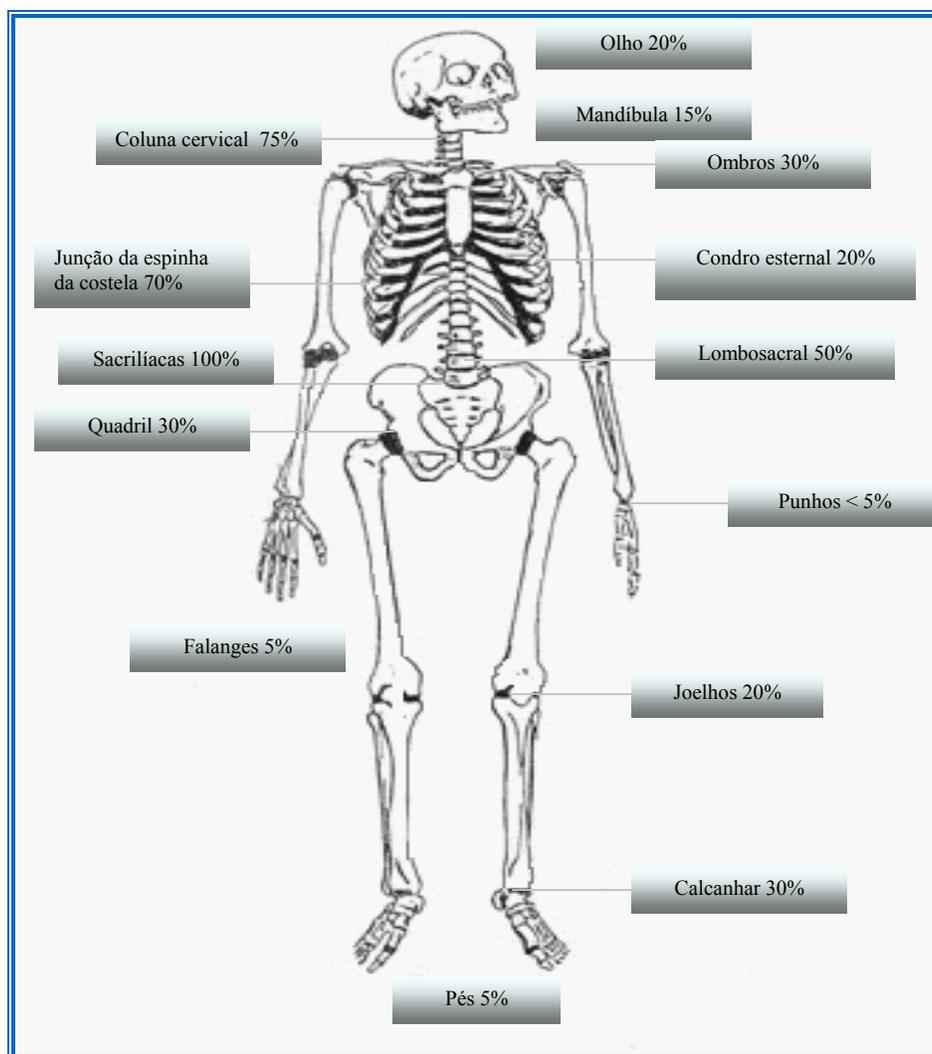


Figura 3 - Áreas do corpo onde a inflamação pode ocorrer e o valor estimado da frequência de ocorrência (em percentagem de doentes afetados). Adaptado: www.anea-sede.rcts.pt

1.1.1.3 - Diagnóstico

A EA é uma doença de progressão lenta e o diagnóstico é geralmente definido tardiamente, especialmente em pacientes com um quadro clínico incompleto (KHAN, 2002). O diagnóstico da EA é feito utilizando-se critérios clínicos e radiológicos; os critérios de New York modificados (van der LINDEN *et al.*, 1984b) são os mais usados para a classificação da EA (Anexo 1). O sintoma mais característico do paciente

espondilítico costuma ser a lombalgia de ritmo inflamatório, que melhora com o movimento e piora com o repouso prolongado, apresentando rigidez matinal prolongada. A evidência radiológica de sacroileíte é obrigatória para o diagnóstico, e a EA pode ser considerada definida quando associada à pelo menos um critério clínico. Um histórico de uveítes anterior aguda, histórico familiar de EA ou espondiloartropatias relacionadas, pode sugerir o diagnóstico clínico. Outros indicadores clínicos são presença de entesites, que podem acometer as sacroilíacas e a coluna vertebral, além de sítios como calcânhar, crista ilíaca e parede anterior do tórax (KHAN 2002).

1.2 - O SISTEMA ANTÍGENO LEUCOCITÁRIO HUMANO

1.2.1 - Localização

O complexo principal de histocompatibilidade (CPH) foi descrito por DAUSSET (1958), e trata-se de um grupo de glicoproteínas polimórficas, encontradas em todos os vertebrados (KLEIN, 1986) e que no homem são denominadas Antígenos Leucocitários Humanos (HLA). Este complexo de quatro megabases é localizado no braço curto do cromossomo 6, mais especificamente na região 6p21.3 (FIGURA 4 e 5) e contém mais de 220 genes (ROBINSON *et al.*, 2003) que codificam três classes de moléculas (classe I, classe II e classe III), classificadas de acordo com a sua estrutura e função. Uma grande característica do CPH é o seu extenso polimorfismo, onde um mesmo gene pode codificar duas ou mais moléculas e cada variante de um gene polimórfico é denominado alelo. Um número cada vez maior desses alelos (GRÁFICO 1) tem sido observado, e segundo o IMGT/HLA o número total desses alelos é de 1743 (www.athynolan.com).

As moléculas de classe I são codificadas por genes localizados na região HLA- A, B e C, enquanto as de classe II na região HLA-D, que é dividida em sub-regiões DR, DQ e DP. Na região da classe II também são codificadas outras moléculas, como TAP (proteínas associadas ao transporte de peptídeos do citosol para o retículo endoplasmático) (PANNER E CRESSWELL, 1998), LMP (protease multifatorial e heterogênica que possui atividade catalítica) (ROCK E GOLDBERGER, 1999), DM (moléculas que catalisam a

ligação do peptídeo na classe II), DN α , e DO β , (codificam a molécula DO, que é um regulador negativo para as moléculas DM) (JANEWAY, *et al.*, 2001) e o gene TAPBP - proteína transmembrana (CRESSWELL, 2000) associada ao mecanismo de processamento de antígenos (MAYER e KLEIN, 2001).

As moléculas de classe III também fazem parte do CPH e seus genes codificam proteínas do sistema complemento (C2, C4), o fator B e citocinas (como o fator de necrose tumoral - α -TNF- α e linfotoxinas).

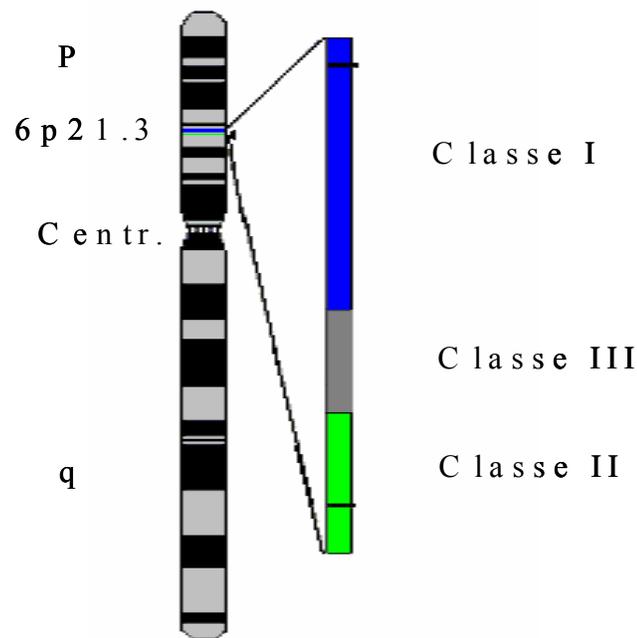


Figura 4 - Cromossomo 6 (www.ncbi.nlm.nih.gov/mhc)

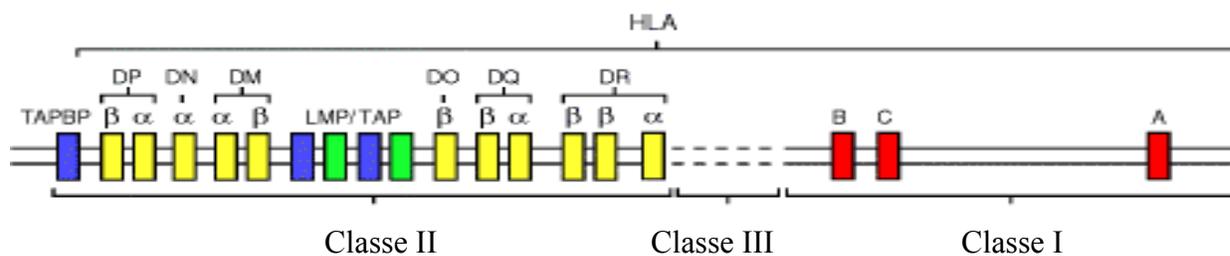


Figura 5 - Organização genética do Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) Humano (Adaptado e modificado: JANEWAY, 2001, www.ncbi.nlm.nih.gov/books)

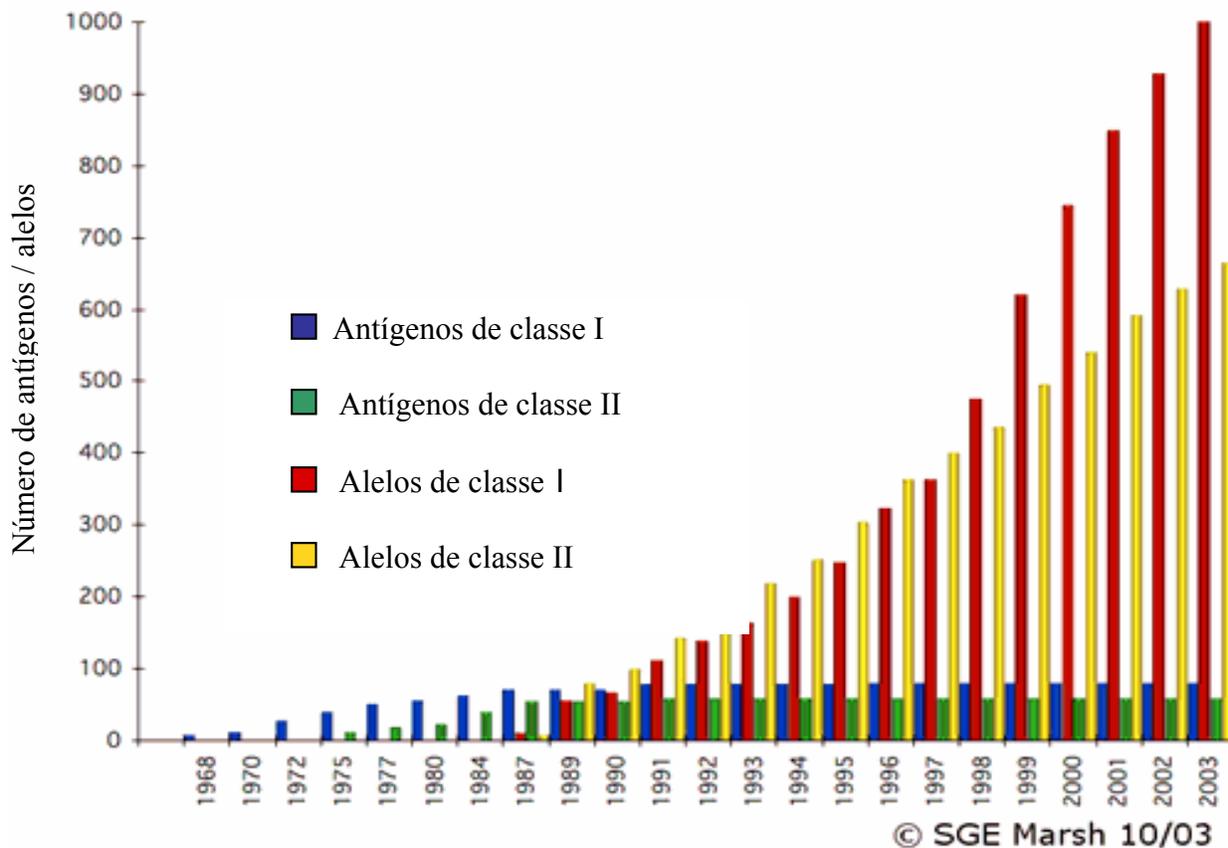


Gráfico 1 - Número de antígenos e alelos de classe I e II identificados desde 1968

Adaptado: IMGTA/ HLA <http://www.anthonynolan.com>

1.2.2 - Estrutura e função

As moléculas de classe I (FIGURA 6) são polipeptídios que consistem em uma cadeia pesada variável (α) transmembrana, ligada a uma molécula β_2 microglobulina (pequena proteína extracelular solúvel codificada fora da região do CPH, no cromossomo 15), chamada de cadeia leve invariante (JONES, 1997). A cadeia α é dividida em três domínios extracelulares (α_1 , α_2 , α_3). Os dois domínios aminoterminais (α_1 , α_2) ligam antígenos endógenos (proteínas virais ou antígenos tumorais) e contém aminoácidos polimórficos que são reconhecidos pelas células T CD8+. As moléculas de classe I são expressas na superfície de quase todas as células nucleadas do corpo bem como nas plaquetas, e sua principal função é apresentar em sua superfície antígenos, que são gerados no citoplasma da própria célula, aos linfócitos T CD8+ citotóxicos, que por sua vez eliminam as células infectadas através da liberação de substâncias tóxicas.

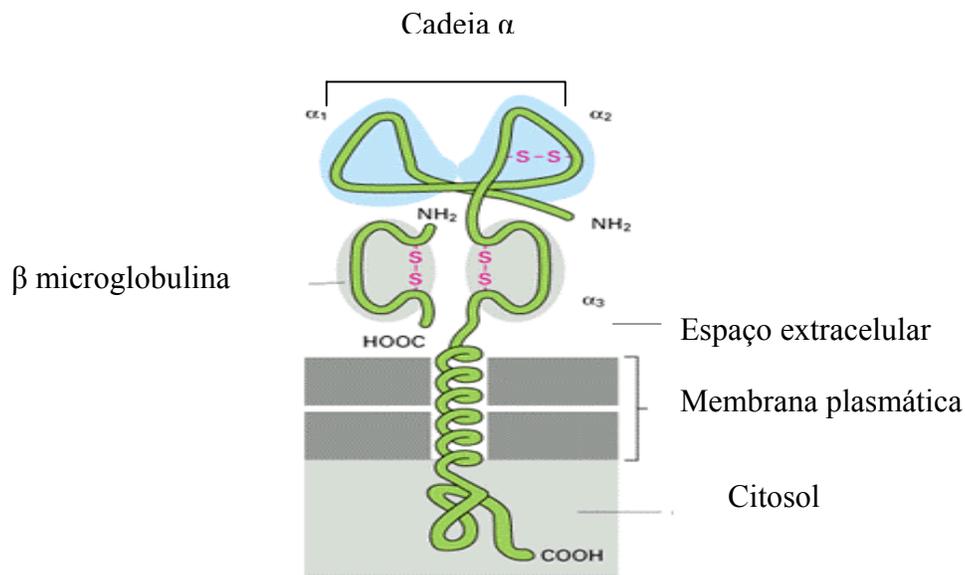


Figura 6 - Molécula HLA-classe I

Adaptado: ALBERTS *et al.*, 2002 (www.ncbi.nlm.nih.gov/books)

As moléculas de Classe II (FIGURA 7) compreendem duas cadeias polipeptídicas contendo dois domínios conservados ($\alpha 2$, $\beta 2$) e dois domínios aminoterminais polimórficos variáveis ($\alpha 1$, $\beta 1$) (JONES, 1997), que ligam antígenos exógenos (proteínas que são endocitadas, ex: proteínas bacterianas) e são reconhecidos pelas células T CD4+. A expressão das moléculas de classe II ocorre preferencialmente sobre células como os linfócitos B, macrófagos, células dendríticas e algumas células endoteliais e sua função é apresentar antígenos que foram degradados no interior da célula aos linfócitos T CD4+, especializados em ativar outras células, como macrófagos e linfócitos B, gerando uma resposta imune ao agente agressor e por vez a sua eliminação.

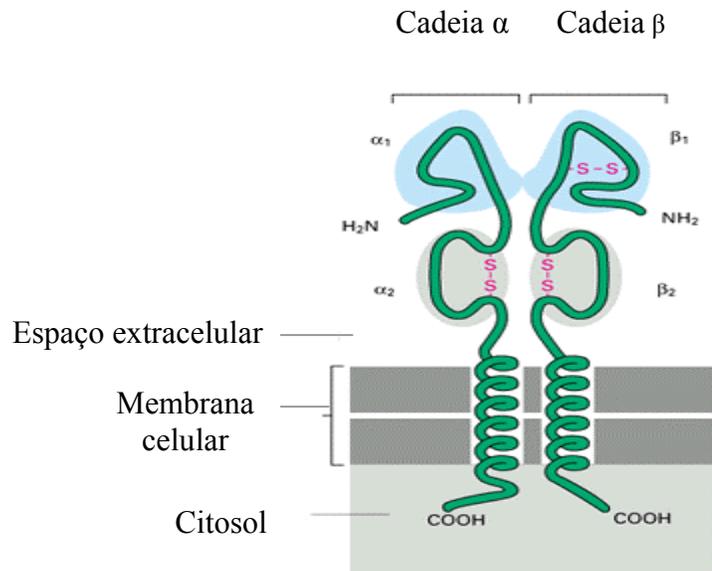


Figura 7 - Molécula HLA-classe II

Adaptado: ALBERTS *et al.*, 2002 (www.ncbi.nlm.nih.gov/books)

1.3 - O POLIMORFISMO DO ANTÍGENO HLA-B27

O polimorfismo do HLA-B27 é resultado das mudanças nos éxons 2 e 3, os quais codificam respectivamente os domínios α_1 e α_2 , e resultam diferenças em um ou mais aminoácidos que formam a fenda de ligação dos peptídeos na molécula HLA-B27 (FIGURA 8). Essas diferenças podem prover a suscetibilidade de certos alelos à EA (KHAN, 2000).

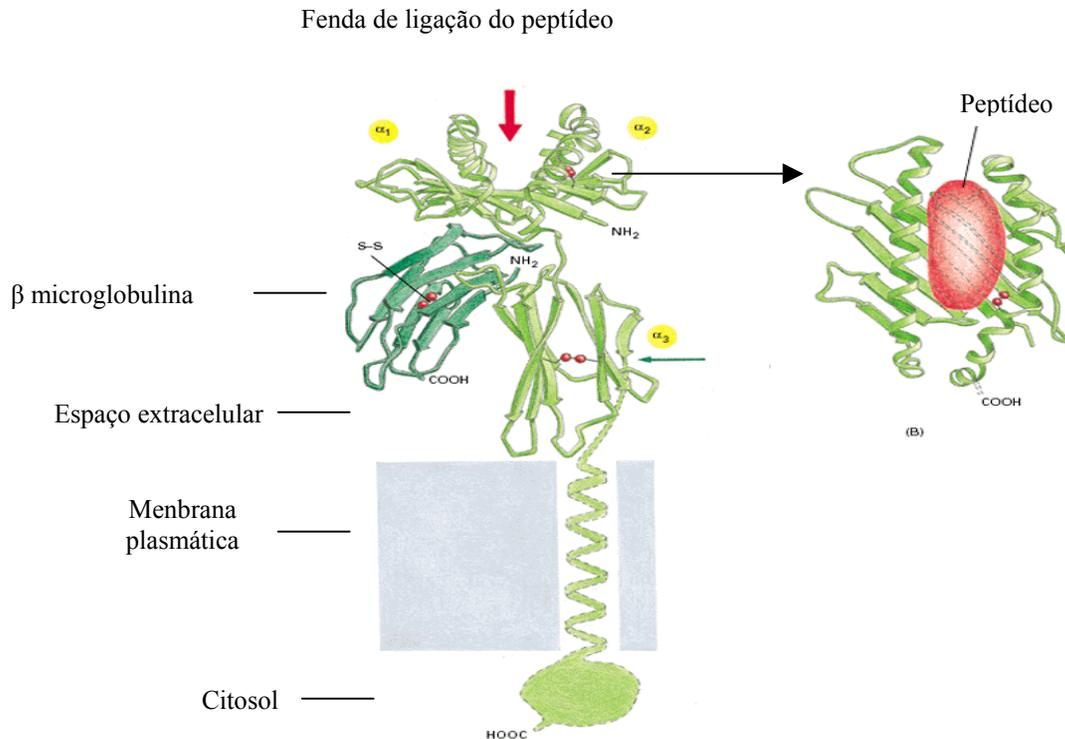


FIGURA 8 - Ligação do peptídeo na molécula HLA de classe I

Adaptado: ALBERTS *et al.*, 2002 (www.ncbi.nlm.nih.gov/books)

As áreas da fenda na molécula do HLA, que interagem com o peptídeo antigênico, são referidas como sítios de ligação de antígenos, designadas pelas letras A-F (JARDETZKY *et al.*, 1991; GARRETT *et al.*, 1989), enquanto que os resíduos de aminoácidos do peptídeo que interagem com esses sítios de ligação são chamados resíduos “anchor”, que são referidos como P1-P9, no caso de peptídeos com 9 resíduos de aa (MATSUMURA *et al.*, 1992). As variantes das moléculas do HLA-B27 têm diferentes sítios de ligação do antígeno (Anexo 2), e conseqüentemente ligam diferentes grupos de peptídeos que possuem de 9 a 10 resíduos de aminoácidos, e os resíduos P2 e P9 são os dois principais “anchors” para a ligação de peptídeos ao HLA-B27. Sabe-se que o sítio de ligação B do HLA-B27 é conservado na maioria dos alelos (BUXTON *et al.*, 1992), e que é altamente seletivo para peptídeos com arginina na posição 2 (P2), sugerindo que o polimorfismo do HLA-B27, fora do sítio de ligação B, pode modular a estrutura de ligação

dos peptídeos em diferentes alelos (GONZALES-ROCES, *et al.*,1997). Estudos recentes indicam que a maioria das diferenças entre os alelos HLA-B27, associados e não associados à EA, está localizada nos sítios de ligação D e F, e que estas diferenças poderiam afetar a ligação de peptídeos artritogênicos (ROVERO, *et al.*, 1994; GONZALES-ROCES, *et al.*,1997).

Até o momento 25 alelos do HLA-B27 (HLA- B*2701 – B*2725) foram identificados (BALL e KHAN, 2001) e, recentemente, uma classificação em três grupos foi proposta para estes alelos, baseada em aspectos estruturais da molécula (RAMOS e LÓPEZ DE CASTRO, 2002) (TABELA 2). A variação na seqüência de aminoácidos na estrutura primária desses alelos e sua distribuição nas diversas populações sugere fortemente que o B*2705 pode ser o alelo ancestral a partir do qual os outros alelos tenham evoluído (ALVAREZ e LOPEZ DE CASTRO, 2000; KHAN, 2000). Entretanto, a evolução dos alelos B*2708, B*2712, B*2716 e B*2723 ainda não está clara. A evolução dos alelos a partir do B*2705 (FIGURA 9) parece estar relacionada a eventos de pequena escala envolvendo mudanças em seguimentos curtos do DNA através de recombinação intra alélica ou conversão gênica. Estes eventos são considerados os principais mecanismos de diversificação do HLA-B27, entretanto a mutação de ponto é também um importante mecanismo de geração de variabilidade do HLA-B27 (RAMOS e LÓPEZ DE CASTRO, 2002 e BLANCO-GELAZ *et al.*, 2001).

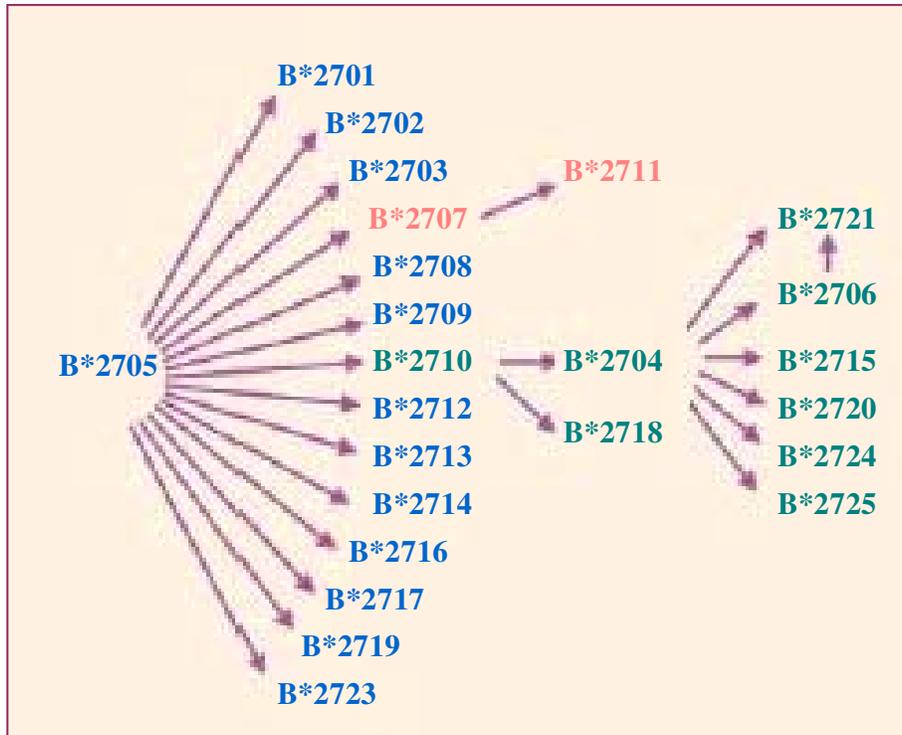


Figura 9 - Hipótese da evolução dos alelos HLA-B27 a partir do B*2705

Adaptado e modificado: RAMOS e LÓPEZ DE CASTRO, 2002.

Tabela 2 - Classificação dos alelos do HLA-B27

GRUPO	SUBGRUPOS	ALELOS	
1	1A	B*2713	Inclui os alelos que diferem a partir do B*2705 por uma simples mudança de aminoácidos devido a eventos genéticos separados (mutação de ponto ou conversão gênica) na seqüência líder (subgrupo 1A), nos domínios $\alpha 1$ (subgrupo 1B) e $\alpha 2$ (subgrupo 1C)
	1B	B*2703, B*2717	
	1C	B*2709, B*2710	
2	2A	B*2701, B*2702, B*2708†, B*2712†, B*2716†, B*2723	Fazem parte deste grupo os alelos que diferem a partir do B*2705 por múltiplas mudanças de aminoácidos no mesmo domínio, presumidamente devido a eventos genéticos separados. Alelos que possuem mudanças no domínio: $\alpha 1$ (subgrupo 2A), $\alpha 2$ (subgrupo 2B)
	2B	B*2707, B*2714, B*2719	
3	3A	B*2704, B*2718	Neste grupo estão inclusos os alelos relacionados a outros do que o B*2705 por eventos genéticos separados, que tenham introduzido um ou mais aminoácidos em domínios separados. Três subgrupos fazem parte desses eventos: subgrupo 3A, consistem em alelos relacionados ao B*2710; subgrupo 3B, consistem em alelos relacionados ao B*2707; e o subgrupo 3C, consistem em alelos relacionados ao B*2704.
	3B	B*2711	
	3C	B*2706, B*2715, B*2720, B*2721#, B*2724, B*2725	

Classificação baseada na relação evolucionária com o B*2705

† A relação evolucionária precisa desses alelos não esta clara

o subtipo B*2721 pode ter evoluído a partir do B*2706

Adaptada e modificada: RAMOS e LOPES DE CASTRO, 2002.

1.4 - ASSOCIAÇÃO DO ANTÍGENO HLA-B27 COM A ESPONDILITE ANQUILOSANTE

Na população geral, 1 a 2% das pessoas HLA-B27 positivas adultas desenvolvem EA (OLIVIERI *et al.*, 2002b) e as chances de uma pessoa HLA-B27 negativa ter a patologia é baixa (GRAN e HUSBY, 1995).

I.4.1 - Prevalência da Espondilite Anquilosante

A incidência da EA é apontada como sendo 6,3/100 000 habitantes (KAIPIANEN-SEPPAENEN e AHO, 2000) e sua prevalência é variável, ficando em torno de 0,1 a 0,9% em populações caucasóides (van der LINDEN *et al.*, 1984; BRAUN *et al.*, 1998); em Asiáticos, varia de 0,01 a 0,4% na China (CHOU *et al.*, 1994; LIU *et al.*, 2000) e 0,01% no Japão (HUKUDA *et al.*, 2001) sendo raramente descrita na África (GONZÁLEZ-ROCES *et al.*, 1997; BROWN *et al.*, 1997). A prevalência da EA está associada com a distribuição do HLA-B27 (TABELA 3), que ocorre de forma bastante heterogênea podendo variar desde a ausência desse antígeno, observado em tribos indígenas da América do Sul (CAVALLI-SFORZA *et al.*, 1994), até altas frequências encontradas em Chukotkas (40% esquimós e 30% chukchi), nativos da Sibéria, na Rússia (KRYLOV *et al.*, 1995). Sabe-se que a frequência deste antígeno em populações caucasóides Européias varia de 2 a 18% (KHAN, 1995), e de 80 a 95% dos pacientes caucasóides com EA (REVEILLE, 1998). Já em outras populações, como os africanos de origem não miscigenada, este antígeno é extremamente infrequente (KHAN, 1995). Porém um estudo realizado em indivíduos da etnia Fula em Gâmbia, oeste da África, foi observada uma prevalência de 6% na população normal e nenhum caso de EA, sugerindo um fator protetor não HLA-B27, reduzindo a prevalência desta patologia nessa população (BROWN *et al.*, 1997a). No Japão a prevalência da EA é a mais baixa e o HLA-B27 aparece numa frequência menor que 1% na população normal (HUKUDA *et al.*, 2001) e em 83% dos pacientes (YAMAGUCHI *et al.*, 1995). Em populações miscigenadas como no México o HLA-B27 está presente numa frequência de 2 a 5% na população normal, enquanto que em pacientes com EA varia de 68 a 80%

(OROZCO-MEDINA, & VÁSQUEZ-ESCOBOSA, 1981; FRAGA *et al.*, 1979; ARELLANO *et al.*,1984); na Venezuela e no Brasil a frequência HLA-B27 em pacientes com EA é observada em 33,3% e 78,2% respectivamente (RIVERA *et al.*,1996, SAMPAIO-BARROS *et al.*, 2001). Em Afro-Americanos 2% possuem o HLA-B27, e aproximadamente 50% dos pacientes negros são positivos para o HLA-B27 (KHAN *et al.*, 1997; OLIVIERI *et al.*, 2002b).

Tabela 3 - Prevalência da Espondilite Anquilosante de acordo com a frequência do HLA-B27 em algumas populações

Populações	Prevalência da EA %	HLA-B27 na população normal %	HLA-B27 na EA %
Caucasóides	0,1 a 0,9	2-18	80 a 95
Chineses	0,01 a 0,4	8	95
Japoneses	0,01	<1	83
Africanas	Baixa	Infrequente	?
México	?	2 a 5	68 a 80
Venezuela	?	?	33,3
Brasil	?	?	78,2
Afro-Americanas	Baixa	2	50

Tabela adaptada a partir do texto acima descrito

1.4.2 - Hipóteses Patogênicas

Muitos estudos têm demonstrado uma forte associação do HLA-B27 com a EA e algumas hipóteses têm sido propostas para explicar o envolvimento de certos alelos do HLA-B27 com esta patologia. A clássica teoria do peptídeo artritogênico (FIGURA 10) prediz que alguns peptídeos próprios apresentados pelo HLA-B27 podem mostrar mimica molecular por componentes antigênicos de microrganismos como, peptídeos bacterianos e virais. (EBRINGER e WILSON, 2000; RAMOS e LÓPEZ de CASTRO, 2002). Um estudo recente identificou um peptídeo próprio com alta homologia com epitopo derivado do vírus Epstein-Barr, restrito ao HLA-B27. Este estudo observou que os linfócitos T citotóxicos são ativados por este peptídeo a partir de indivíduos B*2705, mas não por indivíduos B*2709 (FIORILLO *et al.*, 2000). Uma variante desta hipótese propõe que a apresentação de peptídeos próprios, derivados a partir da própria molécula do HLA-B27 com homologia para proteínas bacterianas, podem ser apresentados como ligantes naturais pelo próprio

HLA-B27, sendo assim responsáveis pela auto-imunidade seguida da infecção bacteriana (SCOFIELD *et al.*, 1995). Sabe-se que ligantes naturais dos alelos B*2702, B*2704 e B*2705, mas não detectados nos alelos B*2706 e B*2709, possuem uma alta homologia com seqüências de proteínas a partir de *Chlamydia* e outras bactérias artritogênicas (ALVAREZ *et al.*, 2001; RAMOS *et al.*, 2002). Uma outra hipótese sugere que células carregando alelos do HLA-B27 associados à EA exibem um alto grau de dissociação da β microglobulina a partir do complexo peptídeo das moléculas do HLA-B27 expressadas na superfície, em relação àquelas expressando alelos não associados como o B*2706 ou B*2709. A consequência seria o acúmulo das moléculas β microglobulina na sinovia, formando depósitos de amilóides ou interagindo com fibroblastos sinoviais, induzindo à síntese e secreção de proteínas, e envolvendo a destruição do tecido (UCHANSKA-ZIEGLER e ZIEGLER, 2003).

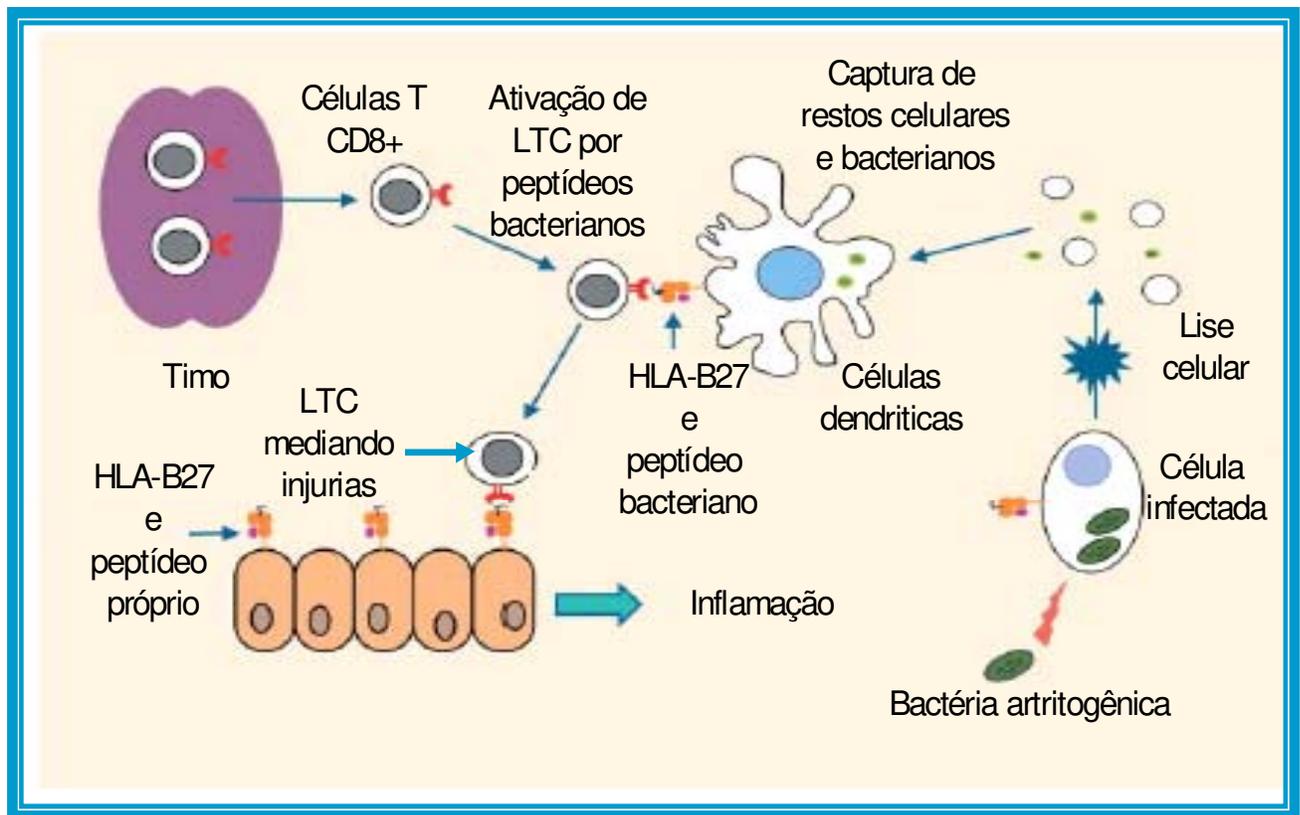


Figura 10 - Hipótese do peptídeo artritogênico

(Adaptado e modificado: RAMOS e LOPEZ DE CASTRO, 2003)

1.4.3 - Associação dos alelos

A distribuição dos alelos do HLA-B27 no mundo ocorre de acordo com o grupo étnico predominante (TABELA 4), e as associações desses alelos na EA e nas ESN são observadas de forma prevalente ou esporádica entre as diversas raças (TABELA 5 e 6). Cada alelo do HLA-B27 é considerado associado positivamente a EA, se, no mínimo, um paciente na população tiver sido relatado, enquanto a associação negativa deve ser sustentada por algum nível de significância estatística (GONZALEZ-ROCES *et al.*, 1997).

1.4.3.1 - Alelos associados

HLA-B*2702: a associação deste alelo na EA é observada em populações caucasóides, e de forma prevalente na França, Sardenha e entre judeus (GONZÁLEZ-ROCES *et al.*, 1997; GUIES-SABATIER *et al.*, 2000; D'AMATO *et al.*, 1995). Relatos deste alelo de forma esporádica em outras populações normais e com EA têm sido descritos na Índia (LOPEZ-LARREA *et al.*, 1995b), na China, no oeste da África (Senegal), e na África do Sul (Hottentot) (GONZÁLEZ-ROCES *et al.*, 1997).

HLA-B*2704: alelo associado à EA de forma predominante em populações asiáticas (GONZÁLEZ-ROCES *et al.*, 1997; NASUTION *et al.*, 1997; REN *et al.*, 1997; YAMAGUCHI *et al.*, 1996), mas também tem sido observado em pacientes com EA entre judeus (GONZALEZ-ROCES *et al.*, 1997), croatas (GRUBIC *et al.*, 2001) e mestiços do México (LOPEZ-LARREA *et al.*, 1995a). Sugere-se que a origem étnica deste alelo possa ter sido na população chinesa e que depois foi expandido para o leste e sul da Ásia (BLANCO-GELAZ *et al.*, 2001). Esta hipótese é reforçada por evidências genéticas e lingüísticas as quais sustentam que, aproximadamente entre 4.000 e 5.000 anos a.C., uma rápida migração para o leste existiu ao sul da China, culminando na colonização da Polinésia e da Nova Guiné (SU *et al.*, 2000).

HLA-B*2705: este alelo é subdividido em B*27052, B*27053 e B*27054 por uma simples substituição de nucleotídeos, porém expressam a mesma molécula do HLA-B27 na superfície da célula (REVEILLE *et al.*, 2001; MASON e PARHAM, 1998,

KHAN e BALL, 2002). Na população normal, e também naquela com EA, é o alelo mais comumente encontrado, sendo que a sua frequência varia entre as populações HLA-B27 positivas. A sua maior frequência (99%) é observada na América do Norte e no leste da Sibéria (KHAN, 2002; LAU *et al.*, 1998; BLANCO-GELAZ, 2001). Este alelo, de acordo com alguns estudos, pode ser o ancestral a partir do qual os outros alelos evoluíram (ALVAREZ e LOPEZ DE CASTRO, 2000; KHAN, 2000), explicando assim sua ampla distribuição no mundo.

HLA-B*2707: a associação deste alelo à EA é observada predominantemente em populações asiáticas (LOPEZ-LARREA *et al.*, 1995b; NASUTION *et al.*, 1997; GONZÁLEZ-ROCES *et al.*, 1997).

1.4.3.2 - Alelos associados de formas esporádicas

HLA-B*2701: alelo muito raro que até o momento foi encontrado em populações caucasóides, em um indivíduo saudável (CHOO *et al.*, 1986) e em três indivíduos com EA (MacLean, 1992; GRUBIC *et al.*, 2001; UEHARA *et al.*, 2001).

HLA-B*2703: alelo predominante em populações africanas (HILL *et al.*, 1991; GONZÁLEZ-ROCES *et al.*, 1997; BROWN *et al.*, 1997), porém tem sido observado de forma esporádica em afro-americanos (KHAN, 1998), em caucasóides nos Açores (ARMAS, 2001), na Tunísia (GONZÁLEZ-ROCES *et al.*, 1997) e no norte da Espanha (GONZALEZ *et al.*, 2002). Na EA há relatos deste alelo em pacientes no Senegal, onde 25% dos pacientes com EA apresentaram o B*2703, conferindo a este alelo uma associação com a patogênese nesta população (GONZÁLEZ-ROCES *et al.*, 1997).

HLA-B*2706: presente em uma alta frequência em populações normais asiáticas, como na Tailândia e em nativos e chineses da Indonésia (LOPEZ-LARREA *et al.*, 1995b; NASUTION *et al.*, 1997; CHEN *et al.*, 2002), havendo apenas dois pacientes com EA descritos na China com este alelo, sugerindo que o B*2706 pode ter um papel protetor ou uma associação negativa com relação à EA nesta população (GONZÁLEZ-ROCES *et al.*, 1997). No entanto, o estudo de duas famílias de origem

miscigenada (chinesa/indonésia), onde alguns membros possuem ambos os alelos (B*2704 e B*2706), mostrou que os heterozigotos foram diagnosticados como ESN, levando a concluir que o B*2706 na presença do B*2704 não teria um papel protetor, possivelmente porque o B*2704 apresenta peptídeos artritogênicos e a atividade da doença não é influenciada pelo B*2706 (SUDARSONO *et al.*, 1999).

HLA-B*2708: este alelo tem sido descrito de forma esporádica em algumas populações caucasóides, como em dois indivíduos normais na população britânica (BROWN *et al.*, 1996) e em dois casos de pacientes com artrite psoriásica (GONSALEZ, *et al.*, 2002) e em um indivíduo normais na Espanha (FERNANDEZ-SUEIRO, 2001) Nos Açores, em uma família que apresentava nove membros com o B*2708, quatro desenvolveram EA (ARMAS, 2001). De forma surpreendente, um estudo recente na Índia Ocidental descreveu este alelo em 12% da população saudável (SHANKARKUMAR *et al.*, 2002). A ligação deste alelo com a artrite psoriásica levanta uma questão importante, a de que o B*2708 é o único alelo conhecido que possui uma ligação de desequilíbrio com o Cw6, fazendo com que indivíduos com este alelo possam carregar no mesmo cromossomo genes para a suscetibilidade à artrite psoriásica. Resta saber se o B*2708 pode influenciar esta suscetibilidade independente do Cw6 (GONSALEZ *et al.*, 2002).

HLA-B*2713: é considerado extremamente raro no mundo, e foi observado apenas em uma família normal no norte da Espanha (GONZALEZ *et al.*, 2002) e associado à EA em um paciente na população brasileira (UEHARA, 2001).

HLA-B*2714: encontrado de forma esporádica em algumas populações, como indivíduos normais na América do Norte (FELDMAN *et al.*, 2002), na Sibéria (GARCIA-FERNANDEZ *et al.*, 2001) e na Índia Ocidental (SHANKARKUMAR *et al.*, 2002), sendo nas duas últimas, associado à EA. Esta observação reforça a postulação de que os nativos da América do Norte tenham como ancestrais siberianos de regiões centrais e do norte (SAILLARD *et al.*, 2000; CRAWFORD, 1998; GARCIA-FERNANDEZ *et al.*, 2001).

HLA-B*2715: este alelo foi observado na Ásia em um indivíduo normal e associado à EA em dois pacientes de procedência tailandesa (GARCIA-FERNANDEZ *et al.*, 2001; VOORTER *et al.*, 2002).

HLA-B*2719: alelo descrito na literatura em apenas um paciente libanês com EA (TAMOUZA *et al.*, 2001).

Os alelos HLA-B*2709 e B*2710 não estão associados à EA, porém são observados em outras ESN. O B*2709 foi associado as espondiloartropatias indiferenciadas em quatro indivíduos na Itália continental (OLIVIERI *et al.*, 2000; OLIVIERI *et al.*, 2002a e MARCHIONNI *et al.*, 1999) (TABELA 6) e observado em 25% de indivíduos normais na Sardenha, mas em nenhum paciente com EA, sugerindo fortemente que este alelo tenha uma associação negativa com a referida patologia nesta população (D'AMATO *et al.*, 1995). Outros estudos realizados em pacientes com EA na Sardenha e na Itália continental confirmam a não associação do B*2709 com esta patologia (MATHIEU e SORRENTINO, 2003). A associação do alelo B*2709 na espondiloartropatias indiferenciadas não foi observada em um estudo recente realizado numa amostra da população brasileira (SAMPAIO-BARROS *et al.*, 2003). O B*2710 é um alelo muito raro, observado em uma família norte-americana caucasóide, com ESN (TAUROG, 1998).

1.4.3.3 - Alelos não associados

HLA-B*2711, B*2718 e B*2720: são alelos encontrados de forma rara em indivíduos normais de origem asiática. Foram observados em uma mulher no Japão (HASEGAWA *et al.*, 1997), em um indivíduo de descendência Chinesa (FELDMAN *et al.*, 2002) e em um homem na Coreia, respectivamente (IMGTA/ HLA <http://www.anthonynolan.com>).

HLA-B*2712: observado em duas famílias normais, uma na Espanha e outra na Inglaterra (BALAS *et al.*, 1998; HEMMATPOUR *et al.*, 1998) e em um doador da América do Norte (IMGTA/ HLA <http://www.anthonynolan.com>). Este antígeno reage com

aloantisóros para o B40/B60 e, segundo Hemmatpour, a associação secundária observada entre EA e B60 em indivíduos B27 positivos e negativos (BROWN *et al.*, 1996), em estudos onde a tipificação molecular não foi padronizada, pode mascarar a presença deste alelo (HEMMATPOUR *et al.*, 1998).

HLA-B*2723: identificado primeiramente numa 5ª geração caucasóide australiana com descendência judaica (DIVINEY *et al.*, 2000; MASCH, 2001) e depois em três famílias no País de Gales (DARKE *et al.*, 2002).

Os alelos, B*2716, B*2717 e B*2721 são observados de forma rara em populações normais caucasóides (STEINER *et al.*, 2001; VOORTER *et al.*, 2002; GANS *et al.*, 2002), enquanto os alelos B*2724 e B*2725 até o momento não estão associados a uma origem étnica específica (IMGT/HLA <http://www.athynolan.com>). O alelo B*2722 foi deletado oficialmente pela Organização Mundial de Saúde em 02 de abril de 2002. O motivo alegado foi que a célula de referência mostrou a mesma seqüência do HLA-B*2706.

Considerando que a população brasileira possui um grande polimorfismo (LOUZADA *et al.*, 2001; BRAUN-PRADO *et al.*, 2000; ALVES-SILVA *et al.*, 2000) à pesquisa dos alelos do HLA-B27 em nossa população normal e com EA podem trazer grandes contribuições, com relação à freqüência dos alelos HLA-B27 relacionados à EA, bem como dos alelos associados de forma negativa ou esporádica nas diversas populações.

Tabela 4 - Distribuição dos alelos HLA-B27 de acordo com o grupo étnico predominante na população geral

Alelos	Grupo étnico Predominante
B*2701; B*2702; B*2708; B*2709; B*2710; B*2712; B*2713; B*2716; B*2717; B*2719; B*2720; B2721; B*2723	Caucasóides
B*2703	Negros
B*2705	Todas as populações
B*2704; B*2706; B*2707; B*2711; B*2715; B*2718	Asiáticas
B*2714	Asiáticas e Nativos da América do Norte
B*2724 e B*2725	Não conhecido
B*2722	Deletado

Tabela adaptada a partir do texto acima descrito

	Croácia	Holanda	Galicia	Sardenha	Espanha	Sul da França	Grã Bretanha	Venezuela/Colômbia	México/Mestiços	Brasil
	Grubic et al;	Breur	Fernandez-Suiero	D'Amato et al,	Fraile et al,	Guis-Sabatier et al,	Brown et al,	Mulatos	Lopez-Larrea et al,	Uehara
	2001	Vriesendorp	2001	1995	1998	2000	1996	Gonzales-Roces et al; 1997	1995a	2001
		et al, 1987				**				
Pacientes	N=45	N=91	N=100	N=35	N=52	N=19	N= 172	N=47	N=64	N= 46
	EA	EA	EA	EA	EA	EA	EA	EA	EA	EA
B*2701	1 (2.1%)	—	—	—	—	—	—	—	—	1 (2,1%)
B*2702	6 (12.5%)	6 (7%)	12 (12%)	35(100)	4 (7,7)	14 (74%)	3 (1,7%)	9 (19%)	3 (4.7%)	4 (8,9%)
B*2703	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
B*2704	1 (2.1%)	—	—	—	—	—	—	—	1 (1.5%)	—
B*2705	37 (83.3%)	85 (93%)	88 (88%)	—	48 (92,3)	5 (28%)	169 (98,3%)	38 (81%)	60 (93.8%)	40 (86,9%)
B*2706	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
B*2707	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
B*2708	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
B*2709	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
B*2713	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1 (2,1%)
Controles normais	N=37	N=70	N=39	N=40	N=35	N= 38	N= 154	N=9	N=8	N=0
B*2701	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
B*2702	9 (23.7%)	7 (10%)	7 (17%)	30(75)	7 (20)	8 (21%)	5 (3.3%)	1 (11%)	2 (25%)	—
B*2703	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
B*2704	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
B*2705	28 (73.7%)	63 (90%)	31 (79%)	—	27 (77.1)	30 (79%)	147 (95.4%)	8 (89%)	6 (75%)	—
B*2706	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
B*2707	—	—	—	—	1 (2.9)	—	—	—	—	—
B*2708	—	—	1 (2,5%)	—	—	—	2 (1.3%)	—	—	—
B*2709	—	—	—	10(25)	—	—	—	—	—	—
B*2713	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

****** Pacientes e controles descendentes da Espanha e Norte da África

Tabela 6 - Distribuição dos alelos do HLA-B27 na população normal e nas ESN

	Nativos da Indonésia Nasution et al, 1997	Chineses da Indonésia Nasution et al, 1997	Japão Yamaguchi et al, 1996	Sul da Itália Olivieri et al, 2002a	Norte da Espanha Gonsalez et al, 2002	Portugal/ Asores Armas, 2001
	N=8 ESN	N=23 ESN	N=21 ESN	N=47 ESN	N=150 ESN	N=32 ESN
B*2701	—	—	—	—	—	—
B*2702	—	—	—	8 (17%)	8 (5.3%)	1 (3.1%)
B*2703	—	—	—	—	1 (0.6%)	—
B*2704	2 (25%)	21 (91%)	14 (67%)	—	—	—
B*2705	6 (75%)	—	7 (33%)	35 (74.4%)	138 (92%)	30 (94%)
B*2706	—	—	—	—	—	—
B*2707	—	2 (9%)	—	2 (4.2%)	1 (0.6%)	—
B*2708	—	—	—	—	2 (1.5%)	1 (3.1%)
B*2709	—	—	—	2 (4.2%)	—	—
B*2713	—	—	—	—	—	—
Controles Normais	N=18	N=8	N=11	N=26	N=97	N=14
B*2701	—	—	—	—	—	—
B*2702	—	—	—	10 (38%)	7 (7%)	—
B*2703	—	—	—	—	—	1 (7.1%)
B*2704	1 (5.5%)	3 (37.5)	9(82%)	—	—	—
B*2705	1 (5.5%)	—	2 (18%)	13 (50%)	88 (91%)	12 (85,8%)
B*2706	16 (89%)	5 (62.5)	—	—	—	—
B*2707	—	—	—	1 (3.8%)	1 (1%)	1 (7.1)
B*2708	—	—	—	—	—	—
B*2709	—	—	—	2 (7.2%)	—	—
B*2713	—	—	—	—	1 (1%)	—

— Não observado

2 - OBJETIVOS

1. Identificar os alelos do HLA-B27 em uma amostra da população brasileira de pacientes com espondilite anquilosante e controles sadios, HLA-B27 positivos.
2. Determinar as frequências desses alelos no grupo de pacientes com espondilite anquilosante e compará-las com as frequências observadas no grupo de controles sadios.
3. Comparar as frequências dos alelos do HLA-B27 determinadas na casuística com as frequências observadas nas diversas populações mundiais.
4. Identificar a existência de histórico familiar de EA no grupo de pacientes e correlacionar com as frequências dos alelos do HLA-B27 na amostra da população estudada.
5. Correlacionar os sintomas iniciais e manifestações clínicas com as frequências dos alelos do HLA-B27.

3 - CASUÍSTICA

3.1 - PACIENTES

Foram avaliados, prospectivamente, 108 pacientes com diagnóstico de EA HLA-B27 positivos segundo os critérios modificados de New York (van der LINDEN *et al.*, 1984), e atendidos no ambulatório de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas, no período de 1998 a 2002. Todos os pacientes são provenientes de várias partes do interior do Estado de São Paulo, onde a população é composta de caucasóides (população branca de origem portuguesa, italiana e/ou espanhola), afro-brasileiros (incluindo negros de origem não miscigenada e mulatos, resultantes da miscigenação de populações brancas e negras) e asiáticos (origem japonesa).

Os pacientes selecionados apresentavam avaliação clínica e radiológica completas. A avaliação clínica incluiu a pesquisa dos sintomas iniciais, envolvimento axial e extra-axial, entesopatias do calcâneo e manifestações extra-articulares (uveíte anterior aguda, envolvimento cardiovascular, pulmonares, renais e ou neurológico). Envolvimento axial foi considerado quando dor inflamatória lombar, torácica e ou cervical estavam presentes (CALIN *et al.*, 1977). O envolvimento extra-axial incluiu a presença de artrite em articulações periféricas e/ou de cinturões. Entesopatia envolveu a presença de dor inflamatória no tendão de Aquiles e/ou fáschia plantar. Manifestações extra-articulares incluíram a presença de uveíte anterior aguda (relatadas pelos pacientes e descritas nas suas pastas). História familiar de EA foi estabelecida baseada nas informações dos pacientes na avaliação inicial.

Avaliação radiológica incluiu a pesquisa do acometimento das sacrolíacas e toda a coluna vertebral. A interpretação radiográfica da bacia foi feita de acordo com as recomendações da New York Conference for Population Studies (BENNETT e BURCH, 1968) e a avaliação radiológica da coluna vertebral incluiu a presença de sindesmófitos isolados bem como o aspecto de coluna em bambu (RESNICK e NIWAYAMA, 1995).

3.2 - CONTROLES

O grupo-controle foi composto de 111 indivíduos normais HLA-B27 positivos. Estes indivíduos foram recrutados a partir de doadores saudáveis de sangue e órgãos sólidos ou doadores de transplante de células primárias hematopoiéticas, atendidos no Laboratório de Imunologia Molecular da Universidade Estadual de São Paulo em Ribeirão Preto e no Laboratório de Imunogenética de Transplantes do Departamento de Patologia Clínica da FCM-Unicamp.

4 - METODOLOGIA

4.1 - EXTRAÇÃO DO DNA

4.1.1 - Obtenção dos leucócitos

A partir de 5ml de sangue periférico, colhido em frasco de vacutainer, com EDTA 15% como anticoagulante, foi realizada a lise das hemácias para a obtenção dos leucócitos das amostras da casuística.

As amostras de sangue foram centrifugadas a 1.800 rpm, por 10 minutos. Depois, o plasma foi descartado e as hemácias lisadas com uma mistura de uma solução 1:10 de cloreto de amônio NH_4Cl (0,144M) e bicarbonato de amônio NH_4HCO_3 (0,01M), por 20 minutos em repouso à temperatura ambiente. Na etapa seguinte, as amostras foram centrifugadas a 3600 rpm, por 15 minutos, sendo depois descartado o sobrenadante. O processo de lise foi repetido até que se obtivesse um “pellet” de leucócitos livres de hemácias.

4.1.2 - Lise dos leucócitos e precipitação do DNA

Ao “pellet” de leucócitos, foram adicionados 1ml de **DNAzolTM** (**Gibco BRL, Invitrogen**). As amostras contendo o **DNAzolTM** foram mantidos por 3 horas em repouso à temperatura ambiente, acrescentado 1ml de etanol absoluto gelado para a precipitação do DNA, que foi retirado com a ajuda de uma pipeta Pasteur e colocado em um eppendorf contendo 300ul de etanol 70% gelado. As amostras foram então centrifugadas a 14.000 rpm por 1 minuto e o sobrenadante descartado. Para a diluição do DNA foi utilizado de 150 a 300ul de água destilada estéril, de acordo com o “pellet” de DNA obtido. Em seguida as amostras foram incubadas a 37°C overnight para a sua solubilização. A quantificação do DNA foi realizada pelo **High DNA MassTM Ladder** (**Gibco BRL, Invitrogen**), um marcador de massa molecular baseado na comparação da intensidade da banda da amostra de DNA teste com a intensidade das bandas do marcador. As amostras foram então estocadas a -20° C para posterior genotipagem.

4.2 - GENOTIPAGEM DOS ALELOS DO HLA-B27

4.2.1 - Reação em cadeia da polimerase por seqüências específicas de “primers” HLA-B27 (PCR-SSP-HLA-B27) de alta resolução (FIGURA 11).

A genotipagem do HLA-B27 foi realizada através da técnica de amplificação pela reação em cadeia da polimerase, utilizando seqüências específicas de primers (*PCR-SSP HLA-B27 alta resolução – HLA-B*2701 - B*2721, DYNAL, Biotech Ltd., UK*). Para cada amostra de DNA dos pacientes e controles HLA-B27 positivos, foram realizados os seguintes procedimentos: em placas de 16 “wells” contendo “primers” liofilizados (um par de “primers” do gene do crescimento humano de seqüência não alélica como controle interno da reação, e um par de “primers” específicos do HLA B27) foi adicionado 10 *ul* de uma solução contendo: tampão PCR, glicerol 5%, nucleotídeos dCTP, dGTP, dATP, dTTP, vermelho cresol, 34.5 *ul* da amostra do DNA (~50ng/*ul*) e 1,44*ul* de *Taq DNA Polymerase* (**GIBCO-BRL, Invitrogen**). Em seguida, a amplificação da PCR foi realizada em um Termociclador (**Progênie**), num total 30 ciclos com desnaturação inicial a 96°C durante dois minutos, seguida dos 10 primeiros ciclos com desnaturação a 96°C, por 10 segundos, pareamento e extensão a 65°C, por 60 segundos e após 20 ciclos com desnaturação a 96°C, por 10 segundos, anelamento a 61°C, por 50 segundos e extensão a 72°C, por 30 segundos (OLERUP 1994)

10ul de uma solução contendo: tampão PCR, dNTP's, glicerol, vermelho cresol, a amostra do DNA do paciente (50ng/ul) e 1,44ul de Taq DNA polimerase (Gibco BRL, Invitrogen)

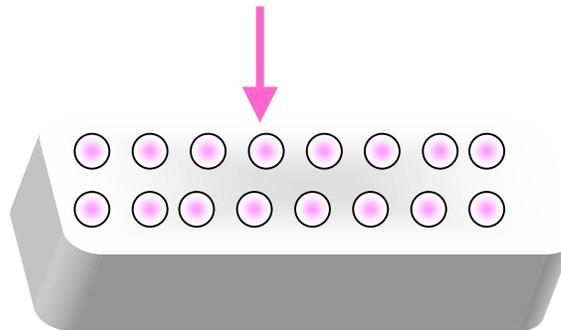


Figura 11 - Esquema da PCR-SSP-HLA-B27

4.2.2 - Detecção dos Produtos Amplificados pela PCR.

Após a reação de amplificação, 4µl do produto da PCR de cada “well” da placa, foram aplicados em uma cuba de eletroforese horizontal contendo gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. Após 30 minutos de corrida, os produtos da PCR foram visualizados sob iluminação ultravioleta e o gel fotografado utilizando o sistema Polaroid, para documentação e posterior análise dos resultados.

4.2.3 - Análise dos Resultados

Através de uma tabela (**TABELA 7**) e um “software” fornecidos pelo Kit Dynal foram realizadas as interpretações dos produtos obtidos pela reação em cadeia da polimerase, identificando os alelos do antígeno HLA-B27 (HLA-B*2701-B*2721), presentes nas amostras de DNA dos pacientes e controles. Na tabela 6 a interpretação da genotipagem dos alelos do HLA-B27 é realizada comparando os produtos amplificados na PCR dos tubos 1 ao 16.

4.3 - MÉTODO ESTATÍSTICO

A frequência dos alelos observada em pacientes e controles foi comparada através da aplicação do teste exato de Fisher para verificar a relação entre alelos e variáveis categóricas. Os *p valores* foram considerados significativos $\leq 0,05$; foi considerada tendência estatística quando $0,1 \geq p > 0,05$.

TABELA 7 - Metodologia utilizada para interpretar os resultados da Reação em Cadeia da Polimerase dos alelos HLA-B27.

INTERPRETATION TABLE
Dynal *AllSet*⁺™ SSP
HLA-B27 "high resolution"

THIS INTERPRETATION TABLE IS VALID FOR BATCH NO. G329 / PRIMER LOT NO. 069-x

Tube No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	Tube No.
Approx. length of PCR Product	410	410	120	395	395	415	410	95	205	90	95	100	375	445	90	120	Approx. length of PCR Product
5' primer(s)1	292 CTT	72 GCT	167 GCT	72 GCT	72 GCT	72 GCT	72 GCT	363 AAT	363 AAT	363 AAT	363 AGC	363 AAT	72 GCT	14 GGA	357 TGG	167 GCT	5' primer(s)1
3' primer(s)1	418 GTC	309 ATC	247 ATG	301 GTC	301 GCT 301 GCT	317 GGA	317 CGC	418 GTC	527 CCT	409 ATA	418 GTA	418 GTG	282 GTG	301 GTC	418 GTC	248 AAA	3' primer(s)1
Tube No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	Tube No.
B*2701	+					+		+									B*2701
B*2702		+				+		+									B*2702
B*2703			+	+		+		+									B*2703
B*2704					+	+		+	+								B*2704
B*27052				+		+		+									B*27052
B*27053				+		+		+									B*27053
B*27054								+									B*27054
B*2706					+	+			+	+							B*2706
B*2707				+		+					+						B*2707
B*2708					+		+	+									B*2708
B*2709				+		+						+					B*2709
B*2710				+		+		+	+								B*2710
B*2711					+	+					+						B*2711
B*2712					+		+	+					+				B*2712
B*2713				+		+		+						+			B*2713
B*2714				+		+									+		B*2714
B*2715 ²					+	+		+	+								B*2715 ²
B*2716				+		+		+					+				B*2716
B*2717				+		+		+								+	B*2717
B*2718					+		+	+	+				+				B*2718
B*2719				+		+											B*2719
B*2720					+	+			+								B*2720
B*2721					+	+											B*2721
B*07021												+					B*07021
B*07022												+					B*07022
B*07023												+					B*07023
B*0703												+					B*0703
B*0704												+					B*0704
B*0705												+					B*0705
B*0706												+					B*0706
B*0708												+					B*0708
B*0710												+					B*0710
B*0713												+					B*0713
B*0715												+					B*0715
Tube No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	Tube No.

Tube No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	Tube No.
B*0716											+						B*0716
B*0719											+						B*0719
B*0720											+						B*0720
B*0722											+						B*0722
B*0801											+						B*0801
B*0802											+						B*0802
B*0803											+						B*0803
B*0804											+						B*0804
B*0805											+						B*0805
B*0806											+						B*0806
B*0807											+						B*0807
B*0808N											+						B*0808N
B*0810											+						B*0810
B*0811											+						B*0811
B*1537					+		+						+				B*1537
B*1545											+						B*1545
B*1801					+		+						+				B*1801
B*1802					+		+						+				B*1802
B*1803					+		+						+				B*1803
B*1806					+		+						+				B*1806
B*3522											+						B*3522
B*3531											+						B*3531
B*3701				+		+							+				B*3701
B*3702				+		+		+					+				B*3702
B*3703N				+		+							+				B*3703N
B*3914											+						B*3914
B*4002					+		+				+		+				B*4002
B*4003					+		+						+				B*4003
B*4004					+		+						+				B*4004
B*4005					+		+				+		+				B*4005
B*4006					+		+						+				B*4006
B*4008					+		+				+		+				B*4008
B*4009											+						B*4009
B*4013		+				+					+		+				B*4013
B*4015											+						B*4015
B*4016											+						B*4016
B*4018											+						B*4018
B*4019											+						B*4019
B*4024											+						B*4024
B*4029											+						B*4029
B*4031											+						B*4031
B*4032											+						B*4032
B*4102											+						B*4102
B*4104											+						B*4104
B*4201											+						B*4201
Tube No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	Tube No.

Tube No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	Tube No.
B*4202											+						B*4202
B*4420															+		B*4420
B*4701				+		+							+				B*4701
B*4702					+		+						+				B*4702
B*4703					+	+							+				B*4703
B*4801											+						B*4801
B*4804											+						B*4804
B*4805											+						B*4805
B*4806											+						B*4806
B*5504											+						B*5504
B*8101											+						B*8101
B*8202					+		+										B*8202
B*8301					+		+										B*8301
Cw*0305											+						Cw*0305
Cw*0705										+							Cw*0705
Tube No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	Tube No.

NOTAS:

Quando a seqüência do nucleotídeo não é conhecida este assume que a seqüência é conservada dentro dos grupos alélicos.

1 – O código do final 3' do “primer”. O número dado é a posição do nucleotídeo.

2 – A seqüência de nucleotídeo do alelo B*2715 não está ainda restabelecida a partir dos dados do “GenBank ou pela “Basic Research in Molecular Biology” (EMBL).

5 - RESULTADOS

A casuística foi composta de 108 pacientes (94 homens 14 mulheres) e 111 controles saudáveis (68 homens e 43 mulheres), onde foram observados os seguintes subtipos: B*2702 (FIGURA 12), B*2703 (FIGURA 13), B*2704 (FIGURA 14), B*2705 (FIGURA 15), B*2707 (FIGURA 16) e B*2713 (FIGURA 17).

5.1 - Distribuição dos alelos do antígeno HLA-B27 no grupo de pacientes e controles (TABELA 8; GRÀFICO 2)

5.1.1 - Pacientes

O alelo observado foi o B*2705 encontrado em 97 pacientes (90%), seguido pelos alelos B*2702 em nove (8%), B*2704 em um (1%) e B*2713 em um (1%).

5.1.2 - Controles

O alelo observado foi o B*2705 encontrado em 89 controles (80%), seguido pelos alelos B*2702 em onze (10%), B*2703 em sete (6%), B*2707 em três (3%) e B*2713 em um (1%).

Tabela 8 - Distribuição dos alelos do antígeno HLA-B27, em pacientes e controles.

ALELOS HLA-B27	PACIENTES N=108	CONTROLES N=111	P
B*2702	9 (8%)	11 (10%)	NS
B*2703	—	7 (6%)*	0,0086 *
B*2704	1 (1%)	—	NS
B*2705	97 (90%)	89 (80%)	NS
B*2707	—	3 (3%)*	0,0086 *
B*2713	1 (1%)	1 (1%)	NS

NS: não significante; * associação estatística dos alelos B*2703 e B*2707 com o grupo controle, comparada ao grupo de pacientes; — Não observado

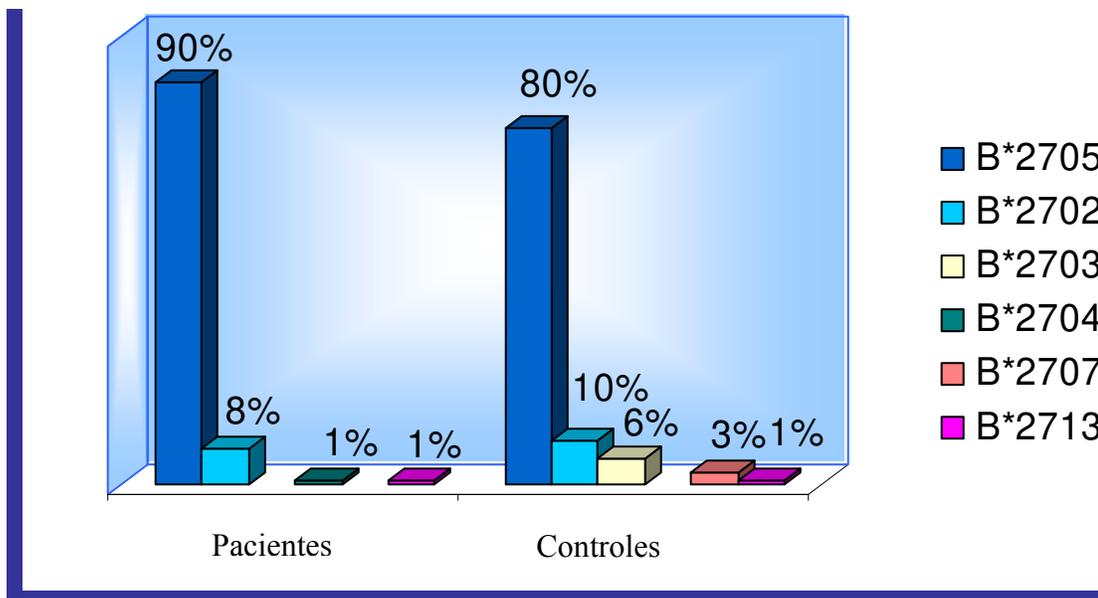


Gráfico 2 - Representação gráfica da distribuição dos alelos do antígeno HLA-B27 no grupo de pacientes e controles.

5.2 - DISTRIBUIÇÃO DOS ALELOS DO ANTÍGENO HLA-B27 DE ACORDO COM A RAÇA (TABELA 9)

5.2.1 - Pacientes: 83 eram caucasóides (77%), 24 afro-brasileiros (22%) e um asiático (1%).

Caucasóides: o alelo B*2705 foi observado em 76 pacientes (92%), seguido pelos alelos B*2702 em seis (7%) e B*2713 em um (1%).

Afro-brasileiros: o alelo o B*2705 foi observado em 21 pacientes (87.5%), seguido do B*2702 em três (12.5%).

Asiática: B*2704 em um paciente (100%)

5.2.2 - Controles: 94 eram caucasóides (85%) e 17 afro-brasileiros (15%).

Caucasóides: O alelo o B*2705 foi observado em 78 controles (83%), seguido pelos alelos B*2702 em 10 (11%), B*2703 em três (3%), B*2707 em dois (2%) e B*2713 em um (1%).

Afro-brasileiros: O alelo B*2705 foi observado em 11 controle (65%), seguido pelos alelos B*2703 em quatro (23%), B*2702 em um (6%) e o B*2707 em um (6%).

Tabela 9 - Distribuição dos alelos do antígeno HLA-B27 nas raças caucasóides, afro-brasileiras e asiáticas.

Alelos HLA-B27	PACIENTES N=108			CONTROLES SAUDÁVEIS N=111	
	Caucasóides 83	Afro-Brasileiros 24	Asiáticos 1	Caucasóides 94	Afro-Brasileiros 17
B*2702	6 (7%)	3 (12.5%)	—	10 (11%)	1 (6%)
B*2703	—	—	—	3 (3%)	4 (23%)*
B*2704	—	—	1 (100%)	—	—
B*2705	76 (92%)	21 (87.5%)	—	78 (83%)	11 (65%)
B*2707	—	—	—	2 (2%)	1 (6%)
B*2713	1 (1%)	—	—	1 (1%)	—

(* p= 0.028) associação estatística do alelo B*2703 com a raça afro-brasileira no grupo controle; — Não observado.

5.3 - CORRELAÇÕES DOS SINTOMAS INICIAIS E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS COM AS FREQUÊNCIAS DOS ALELOS DO HLA-B27 (TABELA 10 E 11)

Não foram observadas associações estatísticas com relação às frequências dos alelos do HLA-B27 e os sintomas iniciais (artrite periférica, lombalgia inflamatória e artrite periférica mais entesopatia) e as manifestações clínicas (envolvimento dorsal, cervical, coxofemural, joelhos, tornozelos, ombros, cotovelos, punhos, sínfise púbica e esternoclavicular, coluna em bambu, entesopatia e uveítes).

Tabela 10 - Frequência dos alelos do HLA-B27 de acordo com os sintomas iniciais da EA.

Alelos do HLA-B27	Sintomas iniciais					
	AP	LI	P	AP+EP	LI	P
	N=31	N=68		N=38	N=68	
B*2702	01(3%)	06(9%)	NS	02(5%)	06(9%)	NS
B*2704	___	01(1%)	NS	___	01(1%)	NS
B*2705	29(94%)	61(90%)	NS	35(92%)	61(90%)	NS
B*2713	01(3%)	___	NS	01(3%)	___	NS

AP=artrite periférica; LI=lombalgia inflamatória; AP+EP=artrite periférica mais entesopatia; NS=não significante; ___ não observado

Tabela 11 - Frequência dos alelos do HLA-B27 de acordo com as manifestações clínicas da EA.

Manifestações clínicas	Alelos do HLA-B27				P
	B*2702 N=09	B*2704 N=01	B*2705 N=97	B*2713 N=01	
Dorsal N=75	08(11%)	01(1%)	66(88%)	___	NS
Cervical N=75	08(11%)	01(1%)	66(88%)	___	NS
Coluna em bambu N=21	01(5%)	___	20(95%)	___	NS
Entesopatia N=41	03(7%)	___	37(90%)	01(3%)	NS
Coxofemural N=37	2(5%)	___	35(95%)	___	NS
Joelhos N=37	04(11%)	___	33(89%)	___	NS
Tornozelos N=54	05(8%)	___	53(90%)	01(2%)	NS
Ombros N=22	2(9%)	___	20(91%)	___	NS
Cotovelos N=2	___	___	2(100%)	___	NS
Punhos N=10	___	___	10(100%)	___	NS
SP N=13	___	___	13(100%)	___	NS
EC N=19	01(5%)	___	18(95%)	___	NS
Uveíte N=17	___	___	17(100%)	___	NS

NS=não significante; EC=esternoclavicular; SP=sinfise púbica; ___=não observado

5.4 - ASSOCIAÇÕES ESTATÍSTICAS

5.4.1 - Pacientes

5.4.1.1 - Histórico familiar de EA

Foram detectados 17 de pacientes, do sexo masculino (15 caucasóides e 2 afro-brasileiros), com histórico familiar de EA. Na pesquisa do histórico foi observado que dos indivíduos afetados na família, 20 são do sexo masculino e um feminino (oito pai, dez irmãos, um avô paterno, um primo de 1^o grau e um sobrinho).

Os alelos observados foram o B*2705 (13 pacientes) e o B*2702 (04 pacientes). Uma tendência estatística foi encontrada com relação ao alelo B*2702 ($p=0.084$) e o histórico familiar de EA quando comparados com todos os alelos observados no grupo de pacientes (TABELA 12). Entretanto, ao se comparar apenas os alelos detectados com recorrência familiar, foi observada uma associação estatística de $p=0,035$ com relação ao alelo B*2702 (TABELA 13; GRÁFICO 3)

Tabela 12 - Tendência estatística observada entre o alelo B*2702 e o histórico familiar de EA, com os alelos observados no grupo de pacientes.

Histórico familiar			
Alelos	Presente	Ausente	P
HLA-B*2702			
N=9	4 (45%)	5 (55%)	
HLA-B2704	—		
N=1		1 (100%)	
HLA-B*2705			0.084
N=97	13 (13%)	84 (87%)	
HLA-B2713	—		
N=1		1 (100%)	
— Não observado			

Tabela 13 - Associação entre o alelo B*2702 com o grupo de pacientes com histórico familiar de EA.

Alelos	Histórico familiar de EA		P
	Presente	Ausente	
HLA-B*2702 N=9	4 (45%)	5 (55%)	0.035
HLA-B*2705 N=97	13 (13%)	84 (87%)	

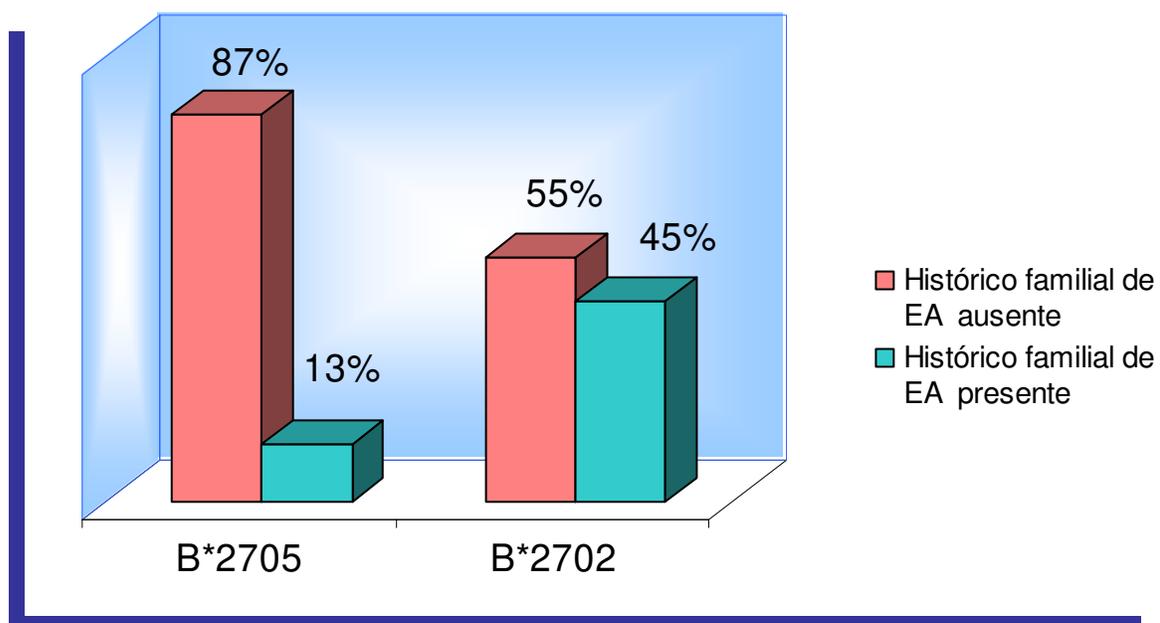


Gráfico 3 - Representação gráfica da distribuição dos alelos HLA-B*2702 e B*2705 com o histórico familiar de EA.

5.4.2 - Controles

5.4.2.1 - Raça afro-brasileira e o alelo HLA-B*2703

Entre os 111 controles saudáveis, 17 eram da raça afro-brasileira onde quatro (23%) apresentaram o alelo B*2703, enquanto que na raça caucasóide, dos 94 apenas três (3%) foram positivos para o mesmo alelo, estabelecendo assim uma correlação estatística ($p=0.028$) entre B*2703 e a raça afro-brasileira (Tabela 9; Gráfico 4)

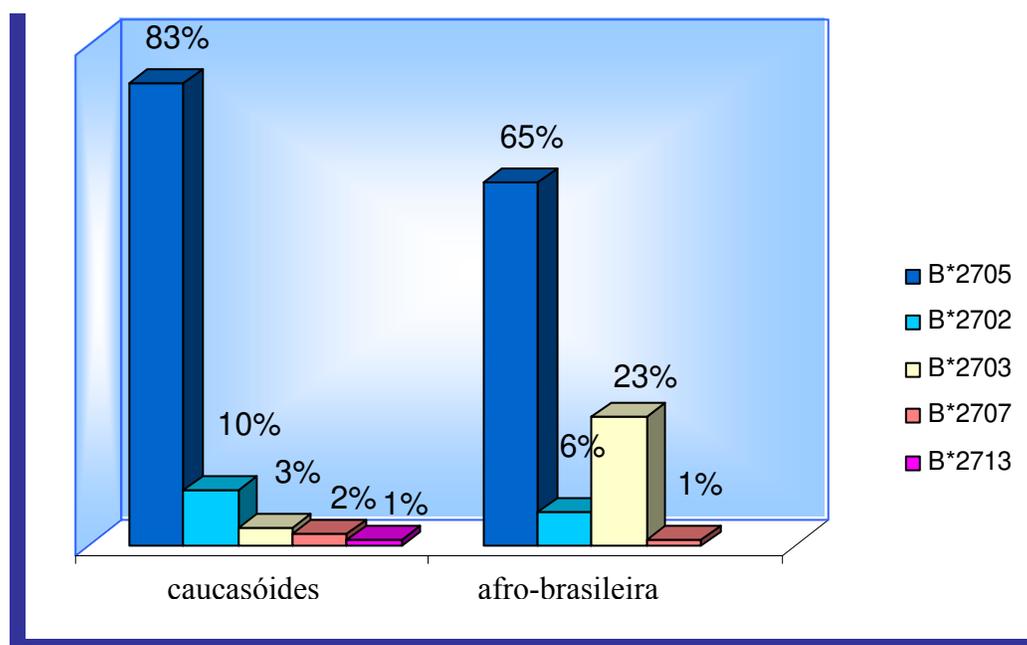


Gráfico 4 - Representação gráfica da distribuição dos alelos HLA-B27 na raça caucasóide e afro-brasileira no grupo controle

5.4.2.2 - Alelos HLA-B*2703 e B*2707 no grupo controle

Os alelos HLA-B*2703 e B*2707 foram observados em 6% e 3% no grupo controle, respectivamente, não sendo observados nos pacientes (TABELA 8; GRÁFICO 2), assim sendo, não foi observada associação ($p=0,131$) quando comparados com o número total de alelos identificados nos controles, no entanto, excluindo o alelo B*2713, foi estabelecida a associação ($p=0,0086$).

5.5 - PADRÃO DE AMPLIFICAÇÃO DOS ALELOS DO HLA-B27 PELA TÉCNICA DE SEQUÊNCIAS ESPECÍFICAS DE “PRIMERS” (PCR-SSP) DE ALTA RESOLUÇÃO.

Legenda:

C.I= bandas de amplificação do controle interno (gene do crescimento humano)

M= marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen)

1-16= número de tubos contendo os “primers” específicos para os alelos HLA-B27

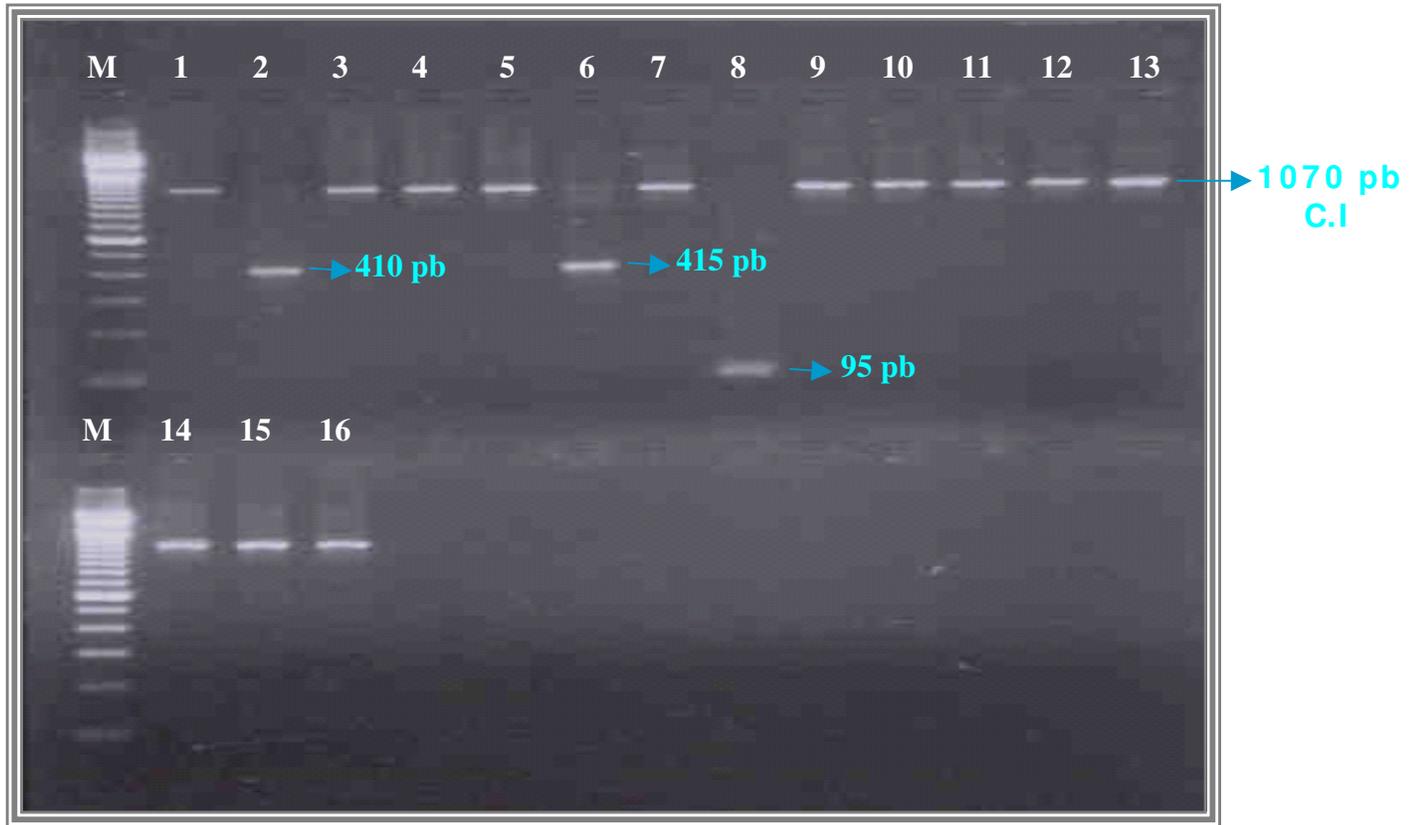


Figura 12 - Alelo HLA-B*2702

Legenda:

Bandas 2, 6, 8 = amplificação específica dos “primers” do alelo B*2702.

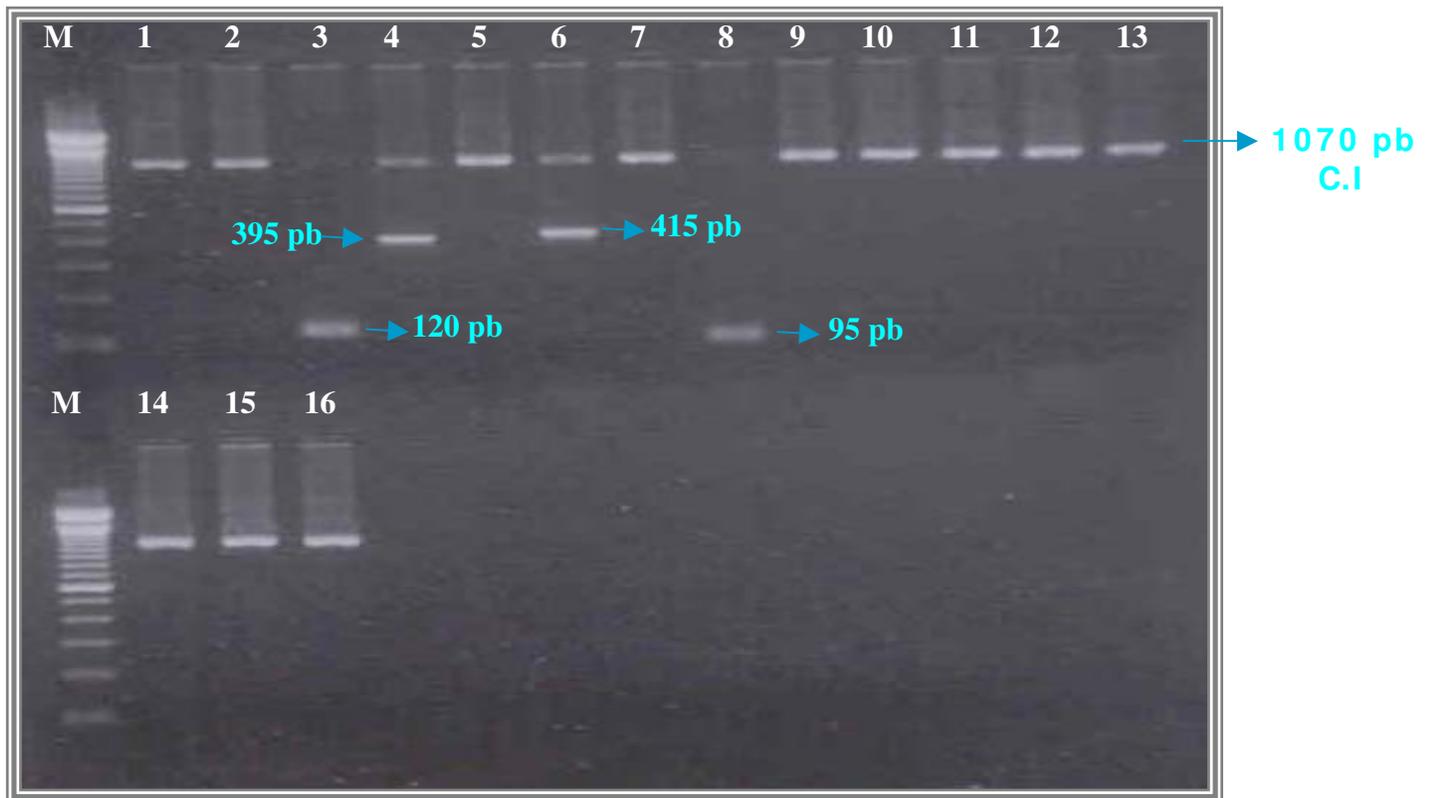


Figura 13 - Alelo HLA-B*2703

Legenda:

Bandas 3, 4, 6 e 8= amplificação específica dos “primers” do alelo B*2703.

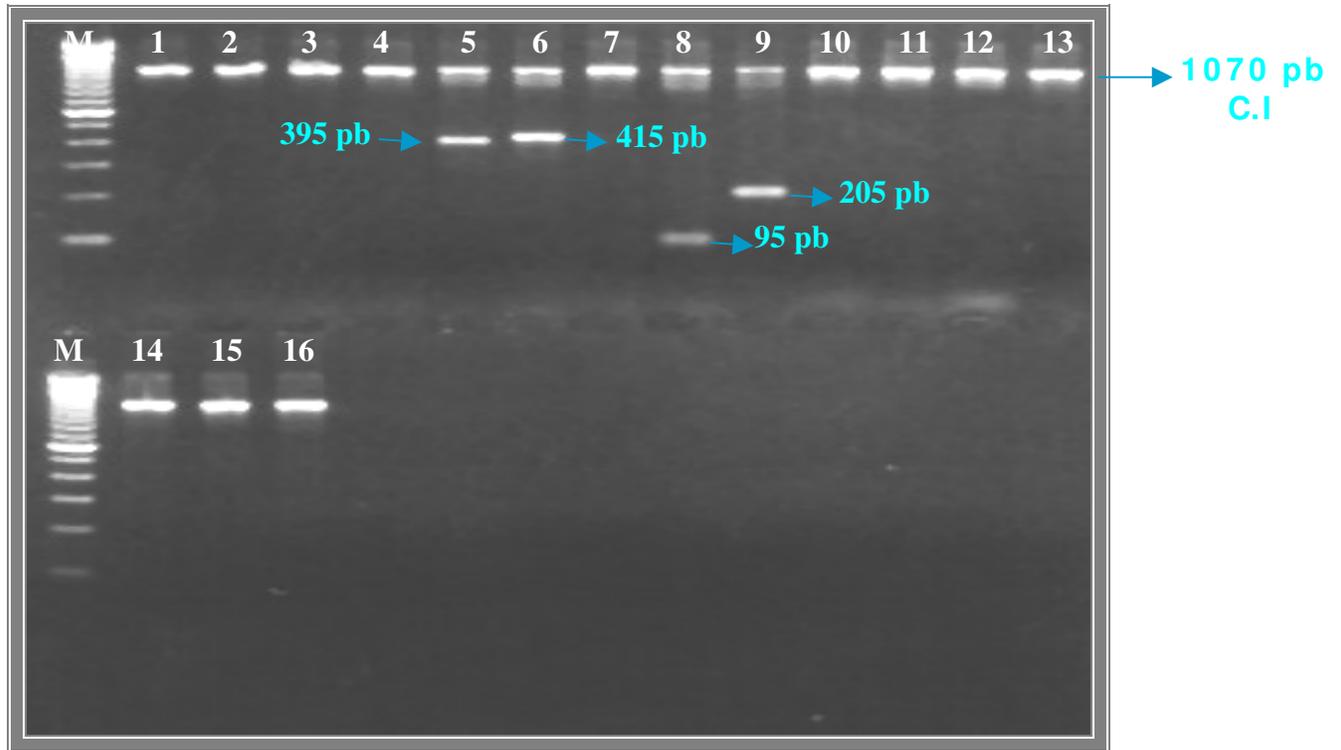


Figura 14 - Alelo HLA-B*2704

Legenda:

Bandas 5, 6, 8 e 9 = amplificação específica dos “primers” do alelo B*2704.

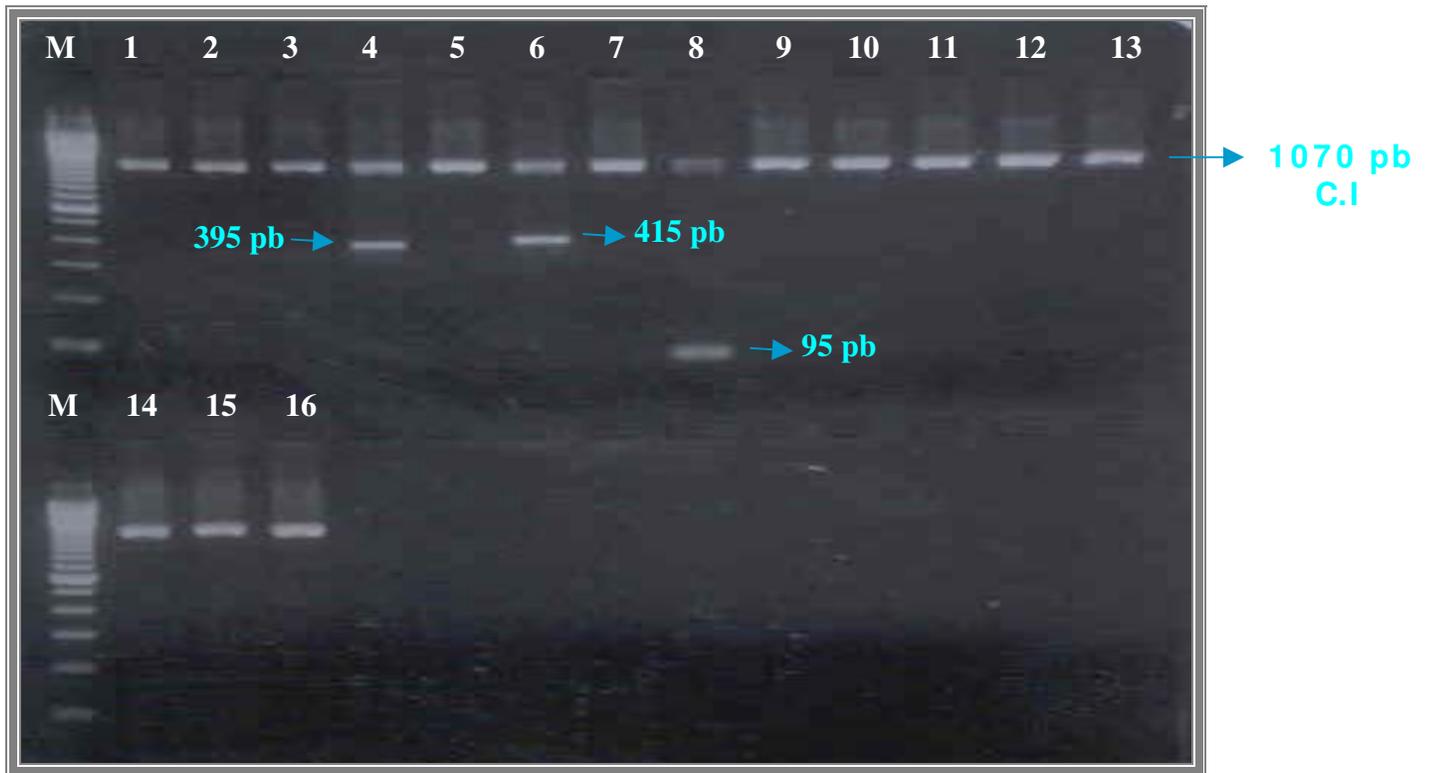


Figura 15 - Alelo HLA-B*2705

Legenda:

Bandas 4, 6 e 8= amplificação específica dos primers do alelo B*2705

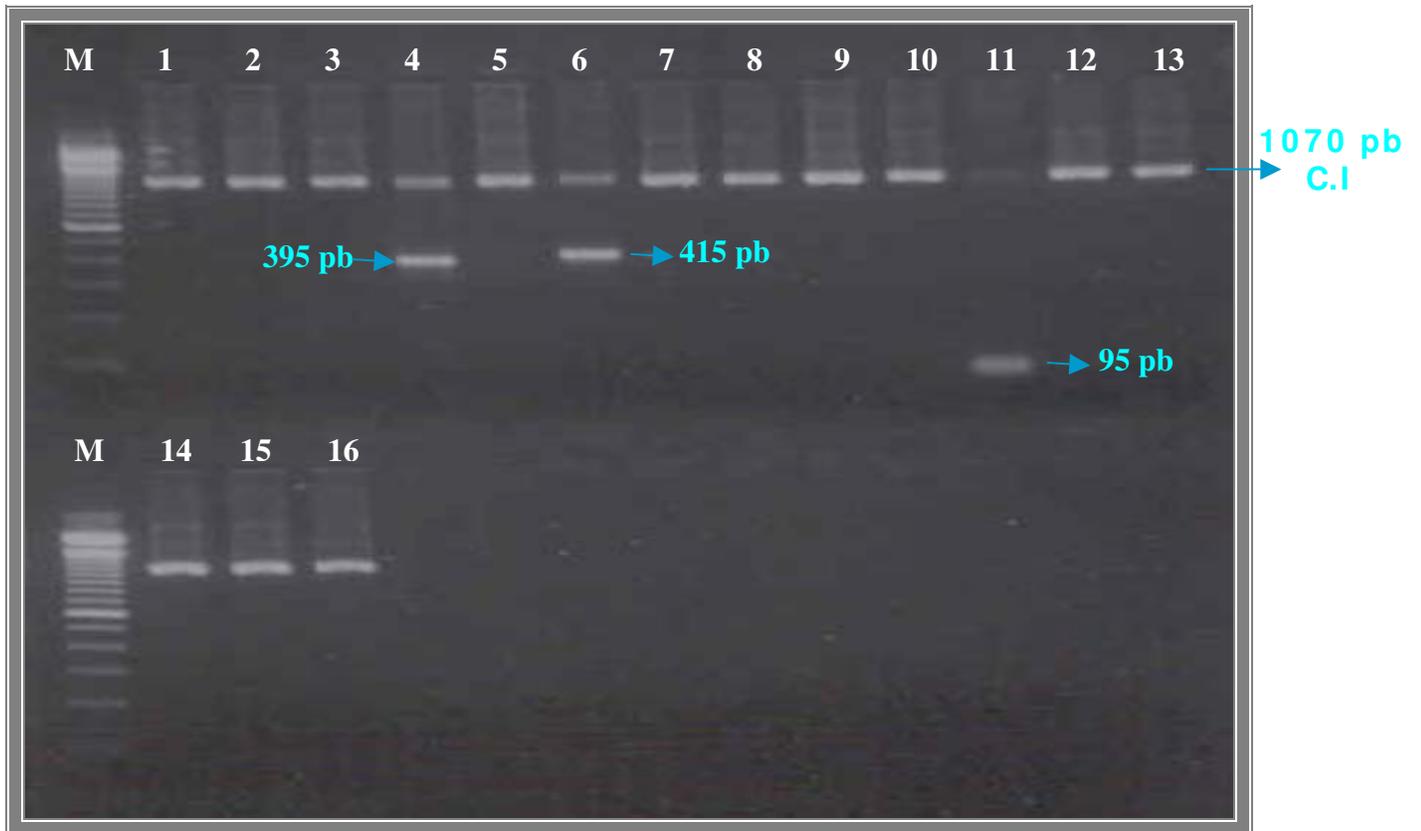


Figura 16 - Alelo HLA-B*2707

Legenda:

Bandas 4, 6 e 11 = amplificação específica dos “primers” do alelo B*2707.

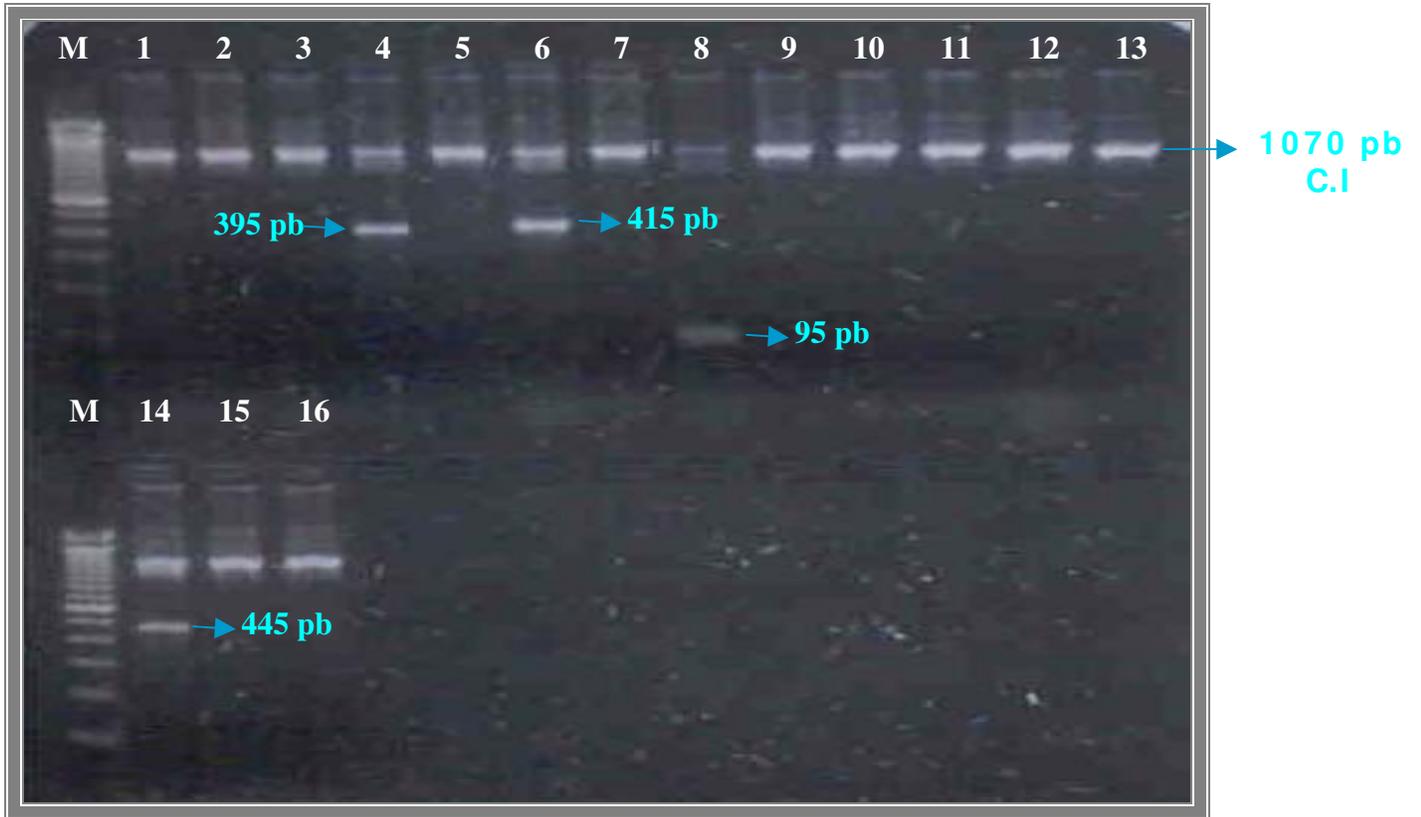


Figura 17 - Alelo HLA-B*2713

Legenda:

Bandas 4, 6, 8 e 14 = amplificação específica dos “primers” do alelo B*2713.

6 - DISCUSSÃO

A população brasileira possui um grande polimorfismo (LOUZADA *et al.*, 2001; BRAUN-PRADO *et al.*, 2000; ALVES-SILVA *et al.*, 2000); isto se deve à intensa imigração que o país recebeu, inicialmente por portugueses e africanos e depois por outros imigrantes europeus e asiáticos. Entre 1820 e 1975, 5.686.133 imigrantes, a maioria europeus, chegaram oficialmente ao Brasil; destes, cerca de 70% eram portugueses e italianos, seguidos pelos espanhóis, alemães, sírios, libaneses, e japoneses (IBGE 2000). Segundo CALLEGARI –JAQUES e SALZANO (1999), durante o período de 1500 a 1972, as porcentagens de imigrantes no Brasil ficaram em torno de 58% de europeus, 40% de africanos e 2% de asiáticos. O resultado de toda esta mistura de raças causou uma grande diversidade genética na população brasileira, comprovada através de alguns estudos, como por exemplo, sobre o polimorfismo dos antígenos HLA classe I, onde um relato recente revelou gradientes entre brancos, mulatos e negros, nas frequências dos alelos e haplótipos dos ancestrais europeus, africanos e ameríndios. O resultado do estudo acima indicou que a população branca apresentou 94% dos alelos e haplótipos dos ancestrais europeus, 3% africanos e ameríndios, enquanto que a população de mulatos apresentou 57% dos alelos e haplótipos dos ancestrais europeus, 39% africanos e 4% ameríndios e a população negra 74% dos alelos e haplótipos dos ancestrais africanos, 25% europeus, e 1% ameríndios (BRAUN-PRADO, 2000).

A distribuição dos alelos do HLA-B27 nas diversas populações, bem como às associações desses alelos com a EA, têm sido descritas em várias populações, diferindo em sua distribuição étnica (TABELA 4 e 5). Até o presente momento, 25 alelos do HLA-B27 (HLA- B*2701 – B*2725) (EDWARD e KHAN, 2001) foram identificados, e alguns desses alelos (B*2702, B*2704, B*2705 e o B*2707) são claramente associados com a EA (REVEILLE *et al.*, 2001). Os alelos B*2701, B*2703, B*2706, B*2708, B*2713; B*2714, B*2715 e B*2719 também já foram observados em pacientes com EA, porém de forma esporádica (MacLean, 1992; GRUBIC *et al.*, 2001; UEHARA, 2001; GONZALEZ- ROCES *et al.*, 1997; ARMAS, 2001; GARCIA-FERNANDEZ *et al.*, 2001; SHANKARKUMAR *et al.*, 2002; TAMOUZA *et al.*, 2001). A explicação para certos alelos do HLA-B27 serem claramente associados à EA pode estar ligada à capacidade desses alelos em apresentar peptídeos próprios com alta homologia a peptídeos bacterianos e virais, ou então, peptídeos próprios derivados da própria molécula do HLA-B27

(EBRINGER e WILSON, 2000; FIORILLO *et al.*, 2000; SCOFIELD *et al.*, 1995; ALVAREZ *et al.*, 2001; RAMOS *et al.*, 2002).

O alelo do HLA-B27 mais comumente encontrado na população saudável e com EA é o B*2705, seguido pelo B*2702, que é um alelo observado em populações caucasóides (GONZÁLES-ROCES *et al.*, 1997). Os alelos B*2704 e B*2707 são freqüentes em populações asiáticas (YAMAGUCHI *et al.*, 1996; LÓPEZ-LARREA *et al.*, 1995b; Ren *et al.*, 1997; NASUTION *et al.*, 1997) e o B*2703 em populações africanas (HILL *et al.*, 1991; BROWN *et al.*, 1997; GONZÁLES-ROCES *et al.*, 1997); porém o B*2707 e o B*2703 têm sido observados também em populações caucasóides (ARMAS 2001; FRAILE *et al.*, 1998; GONZALEZ-ROCES *et al.*, 1997; OLIVIERI *et al.*, 2002; GONZALEZ *et al.*, 2002). Uma associação negativa entre o B*2706 e a EA tem sido relatada em alguns estudos, como em nativos da Indonésia (NASUTION *et al.*, 1997), tailandeses (LOPEZ-LARREA *et al.*, 1995b) e chineses (REN *et al.*, 1997), sugerindo possivelmente um papel de proteção à doença com relação a presença deste alelo nestas populações; porém o B*2706, na presença do B*2704, não exerceria papel de proteção (SUDARSONO *et al.*, 1999). Os outros alelos são encontrados de forma esporádica na população saudável e na EA.

Alelos identificados na casuística

Os alelos identificados na amostra da população estudada, composta de pacientes e controles, foram o B*2702, B*2703, B*2704, B*2705, B*2707 e B*2713 (TABELA 8; GRÁFICO 2). Esses resultados demonstram que a população estudada apresentou um maior polimorfismo em comparação a um estudo anterior realizado na população brasileira, somente em pacientes com EA, onde o alelo predominante foi o B*2705 seguido pelo B*2702, sendo também observados a presença de dois outros alelos, como o B*2701 e B*2713 (UEHARA, 2001).

Alelos predominantes na amostra da população estudada

Neste estudo o B*2705 foi o alelo predominante em 80% da população saudável e em 90% na EA, seguido pelo B*2702 que foi observado em 10% da população saudável e em 8% na EA. Estes dois alelos são predominantes em populações caucasóides, onde o B*2705 aparece numa maior frequência na maioria das populações (BREUR-VRISENDORP *et al.*, 1987; GONZALEZ *et al.*, 2002; BROWN *et al.*, 1996; ARMAS, 2001; OLIVIERI *et al.*, 2002a; GRUBIC *et al.*, 2001; FERNANDEZ-SUEIRO *et al.*, 2001; FRAILE *et al.*, 1998), com exceção em judeus no Oriente Médio, caucasóides no Norte da África - Tunísia e Argélia (GONZÁLEZ-ROCES *et al.*, 1994; GONZÁLEZ-ROCES *et al.*, 1997), bem como na França (GUIES-SABATIER *et al.*, 2000), onde é observada uma maior frequência do B*2702. Na Sardenha o B*2705 está ausente e o B*2702 é o único alelo observado na EA e em 75% da população saudável (D'Amato *et al.*, 1995).

Suspeita-se que o B*2702 tenha sido introduzido na Europa e no norte da África por consequência da imigração a partir do Oriente Médio, e a presença deste alelo em 100% de espanhóis egípcios pode tornar mais consistente esta hipótese (GONZÁLEZ-ROCES *et al.*, 1997), bem como os estudos sobre sua evolução a partir do haplótipo B*2705/CW*02022, o qual foi observado em uma alta prevalência em judeus (GONZÁLEZ-ROCES *et al.*, 1994).

Em populações asiáticas o B*2705 compete com o B*2704 e o B*2706 que são os alelos predominantes na maioria destas populações (YAMAGUCHI *et al.*, 1996; NASUTION *et al.*, 1997; REN *et al.*, 1997; LOPEZ-LARREA *et al.*, 1995b; GONZALEZ-ROCES *et al.*, 1997); o B*2702 aparece esporadicamente em populações asiáticas, como na Índia (LOPEZ-LARREA *et al.*, 1995b), e em chineses (GONZALEZ-ROCES *et al.*, 1997). A Sibéria é a única população do continente asiático que possui uma distribuição dos alelos do HLA-B27 semelhante à maioria das populações caucasóides (GONZALEZ-ROCES *et al.*, 1997).

Na África, os alelos predominantes são o B*2705 e o B*2703, sendo que o B*2705 aparece numa frequência menor que a maioria das populações caucasóides e o B*2702 aparece novamente de forma esporádica, no oeste da África (Senegal), e na África do Sul (Hottentot) (BROWN *et al.*, 1997;).

Analisando os resultados obtidos, neste estudo, com relação aos alelos B*2705 e B*2702, observou-se que a distribuição desses alelos, nesta população, não difere da maioria das populações caucasóides européias, bem como mestiças no México, Venezuela e Colômbia (LOPEZ-LARREA *et al.*, 1995a; MARTINEZ *et al.*, 1999, GONZÁLEZ-ROCES *et al.*, 1997). Nestas populações o B*2705 e o B*2702 são os alelos predominantes na EA, como podemos observar na figura 18. Estes achados são semelhantes a um estudo realizado por UEHARA, 2001 em pacientes com EA na população brasileira.

Associações estatísticas

- Presença dos alelos B*2703 e B*2707 na população controle

Os alelos B*2703 e B*2707 foram somente identificados em nossa população-controle e uma relação estatística significativa ($p=0.0086$) foi observada considerando a presença desses dois alelos nesta população, comparada à casuística de pacientes (TABELA 8; GRÁFICO 2), demonstrando uma associação negativa deste dois alelos com a EA em nossa população estudada.

O B*2707 é um alelo associado à EA predominantemente em populações asiáticas (LOPEZ-LARREA *et al.*, 1995b; NASUTION *et al.*, 1997; GONZÁLEZ-ROCES *et al.*, 1997). Na população caucasóide saudável a sua maior frequência fica entre os judeus, já que este alelo foi observado em 12,5% nesta população (GARCIA-FERNANDEZ *et al.*, 2001). No sul da Itália, este alelo foi observado apenas em um indivíduo (OLIVIERI *et al.*, 2002) e nos Açores, onde foram identificados dois casos, a presença deste alelo é explicada pela possível miscigenação com a população asiática, ou então pela introdução deste alelo na população asiática devido ao longo período de ocupação pelos portugueses no Oriente (ARMAS, 2001; CARVALHO, 1983). Na Espanha, o B*2707 foi observado em dois indivíduos na população saudável (GONZALEZ *et al.*, 2002; FRAILE *et al.*, 1998); a explicação proposta para o fato seria a introdução deste alelo na Espanha pelos judeus (GARCIA-FERNANDEZ *et al.*, 2001; GONZALEZ *et al.*, 2002). Em um estudo feito na Ásia, sobre a diversidade nessa

população, foi sugerido que o B*2707 tenha migrado a partir do Oriente Médio através de uma rota sul, chegando à Índia, espalhando-se ao leste. Esta hipótese é fundamentada em uma maior frequência deste alelo observada em judeus (12,5%) como já descrito, comparada a indianos (5,7%) e chineses (<2%), sugerindo que a migração possa ter sido uma possível causa de muitos gradientes genéticos no extenso continente (GARCIA-FERNANDEZ *et al.*, 2001).

De acordo com os relatos existentes na literatura, duas hipóteses para explicar a presença do B*2707 na população caucasiana saudável têm sido sugeridas em nossa casuística, as quais estariam relacionadas à miscigenação de nossa população. A primeira hipótese tem como base a presença de indivíduos descendentes de asiáticos, portugueses, espanhóis, italianos e judeus, uma vez que o B*2707 é observado nas referidas populações. A segunda seria a de que este alelo teria vindo para o Brasil trazido apenas por portugueses, fortalecendo assim a hipótese de que os mesmos teriam introduzido o B*2707 na população oriental, como sugerido por ARMAS (2001). Quanto à presença do B*2707 em um indivíduo afro-brasileiro (mulatos), poderia ser explicada pelo fato de que esta população apresenta 57% dos haplótipos e alelos do HLA dos descendentes de europeus (BRAUN-PRADO, 2000).

O alelo B*2703 foi observado em nossa população controle em 23% na raça afro-brasileira e em 3% na raça caucasiana. Este alelo é predominante em populações africanas o que explica a sua presença em afro-brasileiros. No norte da América, na população negra, este alelo também tem sido observado, porém de forma rara (KHAN, 1998). Com relação à presença do B*2703 em populações caucasóides, há alguns relatos na literatura: nos Açores (ARMAS, 2001), na Tunísia (GONZÁLEZ-ROCES *et al.*, 1997) e no norte da Espanha (GONZALEZ *et al.*, 2002), onde este alelo foi observado em um indivíduo na população normal nos dois primeiros casos, e na Espanha em um paciente com doença inflamatória do intestino. A presença deste alelo nestas populações foi atribuída à miscigenação com populações descendentes do oeste África. O fato do B*2703 ser encontrado em populações, bem como estudos sobre o polimorfismo do HLA classe I na população brasileira, revelando que a população branca carrega uma frequência de 3% dos alelos e haplótipos dos ancestrais Africanos,

(BRAUN-PRADO, 2000) fortalecem os achados em nossa população saudável onde o B*2703 foi observado na raça caucasóides, atribuindo assim a presença deste alelo à miscigenação de nossa população com ancestrais africanos.

- O alelo HLA-B*2703 e a raça afro-brasileira na população controle

Sabemos que a prevalência da EA está associada à frequência do HLA-B27 na população. Em Africanos a frequência deste antígeno é baixa (KHAN, 1995) e o alelo B*2703 é observado, como já descrito, predominantemente nesta população. Visto que esta patologia é extremamente rara em populações Africanas este alelo é considerado não associado à EA (HILL *et al.*, 1991; BROWN *et al.*, 1997), embora existam alguns casos descritos no Senegal deste alelo associado a esta patologia (GONZÁLEZ-ROCES *et al.*, 1997). De forma interessante, em indivíduos de etnia fula em Gâmbia, o risco desta população desenvolver EA é baixo apesar de 6% deste grupo ser positivo para o HLA-B27 (68% B*2705 e 32% B*2703), atribuindo a este fato a ausência de um desencadeador ambiental ou fatores genéticos adicionais de suscetibilidade, sem ser o HLA-B27, reduzindo assim a prevalência da EA nesta população (BROWN *et al.*, 1997).

Em nossa casuística, dos 111 controles saudáveis, 17 são afro-brasileiros, onde o alelo B*2703 foi identificado numa frequência de 23%, sendo observada uma associação de $p=0.028$ em relação à presença deste alelo nesta raça (TABELA 9; GRÁFICO 4). Portanto na amostra da população estudada o B*2703 não é considerado raro na raça afro-brasileira. Com base nesses resultados pode-se sugerir que a presença do B*2703, associado à raça afro-brasileira, poderia talvez influenciar a frequência da EA nesta população, uma vez que este alelo é descrito como não associado a esta patologia (HILL *et al.*, 1991). Em contrapartida, a hipótese de que a ausência de fatores genéticos adicionais de suscetibilidade, como fatores de proteção em populações africanas (BROWN *et al.*, 1997), poderia também influenciar a frequência da EA em afro-brasileiros. Porém não existem estudos com relação à prevalência da EA em populações afro-brasileiras, e o presente estudo é o primeiro a determinar a frequência dos alelos do HLA-B27 na população saudável, o que dificulta um estudo sobre a associação do B*2703 com relação à EA em afro-brasileiros.

- Associação do alelo B*2702 com história familiar de EA

Na França, um recente estudo com descendentes espanhóis e do norte da África, demonstrou uma alta frequência do alelo B*2702 em pacientes com EA (74%), comparada a indivíduos saudáveis (21%). Em contraste a frequência do B*2705 foi observada em 28% dos pacientes e nos indivíduos saudáveis em 79%. Os autores sugeriram que o B*2702 é um alelo susceptível enquanto o B*2705 é um alelo protetor no desenvolvimento da EA na população estudada (GUIS-SABATIER *et al.*, 2000). Esta conclusão foi questionada por OLIVIERI (2002) em um estudo realizado na Lucânia, no sul da Itália, onde o B*2702 é observado bastante frequente, e o autor concluiu que este alelo não confere um maior risco à doença do que o B*2705. Em outras populações caucasóides, como na Sardenha e em judeus, onde este alelo é o prevalente, também se observa que o B*2702 aparece numa frequência maior na EA em relação à população saudável (GONZÁLEZ-ROCES *et al.*, 1997; D'AMATO *et al.*, 1995). Em nosso estudo o alelo B*2702 não foi observado em uma alta frequência na amostra de pacientes e controles, porém, foi estabelecida uma associação estatística significativa de $p=0,035$ deste alelo com histórico familiar de EA (TABELA 13; GRÁFICO 3), um fato não descrito em estudos similares. Esta associação é importante visto que este alelo é observado em algumas populações em uma alta frequência na EA, mas é necessário confirmar a associação deste alelo com o histórico familiar de EA em outros estudos.

Presença dos alelos B*2704 e B*2713 na população estudada

Ambos os alelos B*2704 e o B*2713 foram observados em nossos pacientes, um de origem asiática e outro caucasóides, respectivamente, sendo que o B*2713 também foi observado em um controle caucasóide.

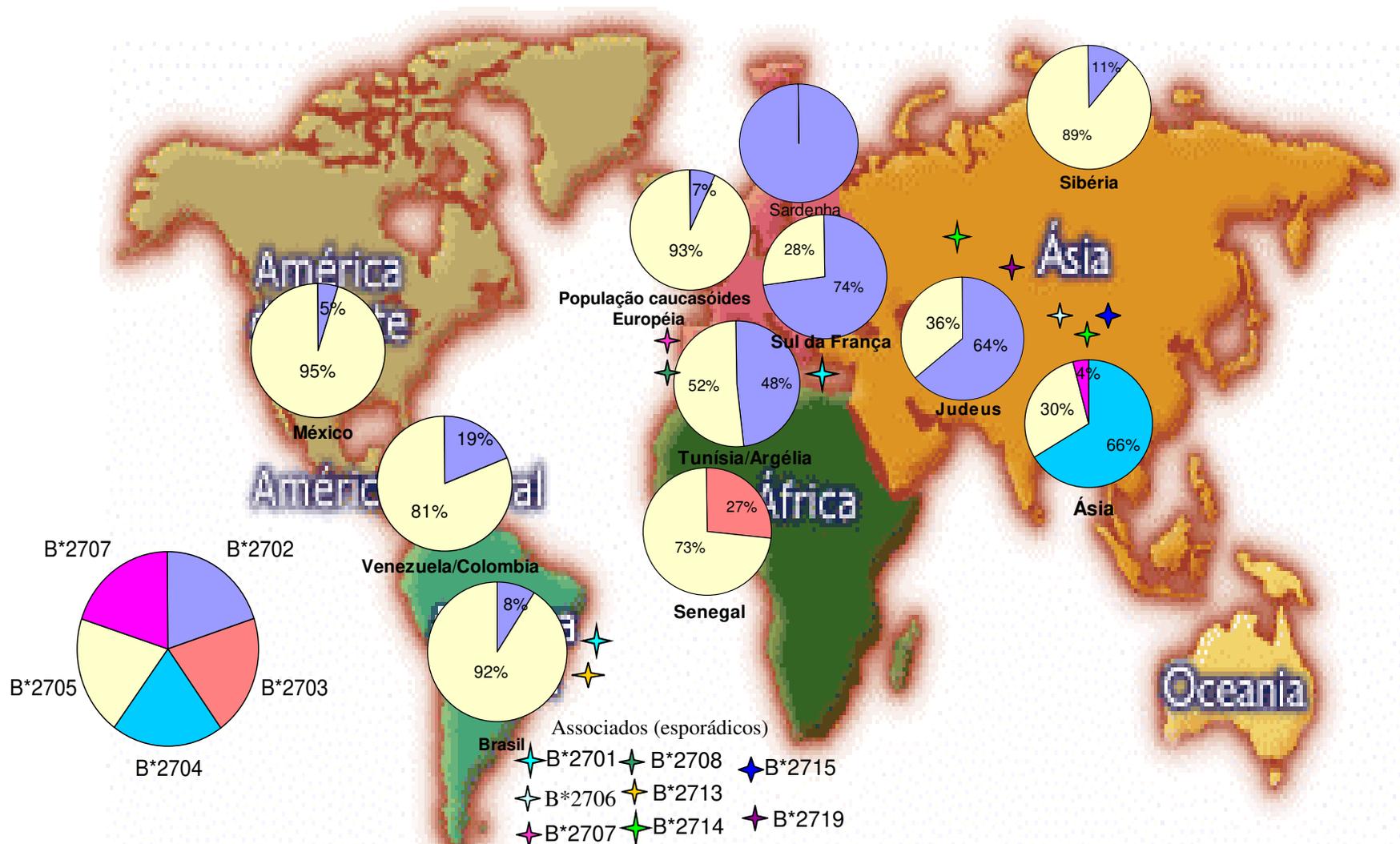
O B*2704 está presente em uma maior frequência na Polinésia e é o alelo prevalente em populações asiáticas (GONZÁLEZ-ROCES *et al.*, 1997; NASUTION *et al.*, 1997; REN *et al.*, 1997; YAMAGUCHI *et al.*, 1996; LOPEZ-LARREA *et al.*, 1995b). Nestas populações este alelo aparece associado à EA numa alta frequência, salvo a população da Polinésia, onde o estudo foi realizado apenas em indivíduos saudáveis, e em nativos da Indonésia, onde sua frequência é menor em relação a outras populações asiáticas, em torno de 25% (NASUTION *et al.*, 1997). Este alelo também tem sido

observado associado à EA de forma esporádica em populações caucasianas, como em judeus e croatas (GONZALEZ-ROCES *et al.*, 1997; GRUBIC *et al.*, 2001), e na população mestiça do México (LOPEZ-LARREA *et al.*, 1995a). A presença do B*2704 em um paciente asiática em nossa casuística condiz com os relatos acima descritos, de que o B*2704 está associado à EA e presente em populações de origem asiática.

O alelo B*2713 até o momento foi observado apenas em uma família saudável no norte da Espanha (GONZALEZ *et al.*, 2002) e associado à EA em um paciente brasileiro caucasóides (UEHARA, 2001). Algumas considerações a respeito da molécula do B*2713 devem ser ressaltadas. A estrutura da molécula expressa na superfície da célula é idêntica aos dos alelos B*27052, B*27053 e B*27054, diferindo do B*27052 por uma mutação pontual (C para A) (SEURYNCK e BAXTER-LOWE, 1998), sugerindo que esta mudança pode alterar a expressão da molécula do HLA, podendo contribuir para o desenvolvimento da doença (REVEILLE *et al.*, 2001). Com base nestas informações sugeriu-se que a associação do B*2713 à EA, em um dos nossos pacientes, pode estar associada ao fato desta molécula se expressar de forma idêntica à molécula do B*2705. Em relação à presença deste alelo em nossa população caucasóide, pode-se sugerir que o mesmo possa estar associado a esta raça, uma vez que este alelo já foi descrito nesta população em outros estudos (GONZALEZ *et al.*, 2002; UEHARA, 2001) e não existem relatos em populações asiáticas ou africanas, porém, devido ao fato deste alelo ser extremamente raro, é necessário mais relatos para que se possa concluir a sua real origem étnica.

Correlações dos sintomas iniciais e manifestações clínicas com os alelos do HLA-B27

Não há estudos na literatura sobre uma possível associação de agressividade a EA correlacionada aos alelos do HLA-B27. Este foi o primeiro estudo comparando as manifestações clínicas e sintomas iniciais com as frequências dos alelos do HLA-B27 (TABELA 10 E 11), e os resultados não demonstraram nenhuma associação estatística dos alelos observados com relação à clínica dos pacientes. Porém foi observado que no grupo de paciente com uveíte o B*2705 foi o único alelo presente.



Ref: **CAUCASÓIDES** (Croácia - Grubic *et al.*, 2001; Holanda - Breuer Vriesendorp *et al.*, 1987; Galicia - Fernandes-Suiero 2001; Espanha - Fraile *et al.*, 1998; Grã-Bretanha - Brown *et al.*, 1996), **SARDENHA** - D' Amato *et al.*, 1995, **SUL da FRANÇA** (Guis-Sabatier *et al.*, 2000), **ÁSIA** (Índia , Tailândia - Lopez-Larrea *et al.*, 1995 ; Chineses - Gonsales-Roces *et al.*, 1997; Singapura - Ren *et al.*, 1997); **VENEZUELA/COLÔMBIA** - Gonzalez-Roces *et al.*, 1997; **MÉXICO** - Lopez-Larrea *et al.*, 1997); **ÁFRICA** (Senegal, Tunísia/Argélia), **SIBÉRIA, JUDEUS** - Gonzalez-Roces *et al.*, 1997; **BRASIL** - Conde *et al.*, 2003)

FIGURA 18 - Distribuição geográfica dos alelos do HLA-B27 prevalentes na população com EA

7 - CONCLUSÕES

- 1a** Os alelos identificados nos pacientes e controles foram o B*2702, B*2703, B*2704, B*2705, B*2707 e B*2713, demonstrando que a amostra da população estudada, composta de caucasóides e afro-brasileiros, apresentou um grande polimorfismo que podemos atribuir a miscigenação de nossa população.
- 1b** Este estudo confirma que diferentes origens genéticas e geográficas podem contribuir significativamente para o polimorfismo dos alelos dos HLA-B27 na população brasileira.
- 2a** Os alelos B*2702, B*2704, B*2705 e o B*2713 estão relacionados à EA na amostra da população estudada, sendo necessário, porém, mais relatos do B*2713 para que seja possível confirmar a relação desse alelo com a doença.
- 2b** A associação significativa dos alelos B*2703 e B*2707 em nossa população controle mostra que esses alelos estão associados de forma negativa com a EA na amostra da população estudada.
- 2c** A associação significativa do alelo B*2703 em afro-brasileiros, na população controle, pode estar influenciando a frequência da EA na amostra da população estudada.
- 2d** A presença do alelo B*2713 em nossa população caucasóide sugere que este alelo possa estar associado a esta raça, mas são necessários outros relatos para que se possa concluir a sua real origem étnica.
- 3** A distribuição dos alelos predominantes na amostra da população estudada não difere da maioria das populações caucasóides européias com EA, bem como mestiças no México, Venezuela e Colômbia, onde o B*2705 e o B*2702 são os alelos predominante.
- 4** O alelo B*2702 esteve associado ao histórico familiar de EA um fato não descrito em estudos similares.
- 5** Não foram observadas associações significantes dos alelos do HLA-B27 com os sintomas iniciais e as manifestações clínicas na amostra da população estudada.

*8 - REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS*

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Cell in their social context (Part IV): **Molecular Biology of the cell**. Ed. Taylor & Francis, (4^o edition), 2002. Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov/books>. Acesso em: 28 maio 2003.

ALLEN, R. L.; O' CALLAGHAN, C. A.; McMICHAEL, A. J.; BOWNESS, P. Cutting edge: HLAB27 can form a novel beta 2-microglobulinfree heavy chain homodimer structure. **J Immunol.** 162: 5045–5048, 1999.

ALVAREZ, I.; LOPEZ DE CASTRO, A. L. HLA-B27 and immunogenetics of spondyloarthropaties. **Curr Opinion Rheumatol**, 12:248-253, 2000.

ALVAREZ, I.; SESMA, L.; MARCILLA, M. RAMOS, M.; MARTI, M.; CAMAFEITA, E.; et al. Identification of novel HLA-B27 ligands derived from polymorphic regions of its own The recognition of HLA-B27 by human CD4 and B*2709 complexed with the same peptides - or other class I molecules based on, generation by 20S proteasome. **J Biol Chem**, 276: 32729–37, 2001.

ALVES-SILVA J, SANTOS MS, GUIMARÃES PEM, FERREIRA ACS, BANDELT H-J, PENA SDJ, *et al.* The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. **Am J Hum Genet**, 67:444-61, 2000.

AMOR, B.; DOUGLADOS, M.; MIJIYAWA M. Critères de classification des spondylarthropathies. **Rev du Rheum et des Mal Ostéoart** 57:85-89, 1990.

ARELLANO, J.; VALLEJO, M.; JIMÉNEZ, J.; MINTZ, G.; KRETSCHMER, R.R. HLA-B27 and ankylosing spondylitis in Mexican mestizo population. **Tissue Antigens**, 23:112, 1984.

ARMAS, J.O.B. **Espondilartrites e Doenças Associadas . Heterogeneidade Genética e sua Expressão**. Porto-Portugal, 2001. (Tese de Doutorado - Universidade de Porto).

ANEA. Associação nacional de espondilite anquilosante. Disponível em: < <http://www.anea-sede.rcts.pt> >. Acesso em: 30 out. 2003.

ARNETT, F. C.; HOCHBERG, M. C.; BIAS, W. B. Cross-reactive HLA antigens in B27-negative Reiter's syndrome and sacroiliitis. **Johns Hopkins Med J**, 141:193-7, 1977. (appud SAMPAIO-BARROS, 2003)

BALAS, A.; SANTOS, S.; GARCIA-SANCHEZ, F.; LILLO, R.; MERINO, J. L.; VICARIO, J. L. Complete coding sequence of HLA-B*2712: a serologic B27-negative antigen associated to Bw6. **Tissue Antigens**, 51:394-7, 1998.

BALL, E.; KHAN, M. A. HLA-B27 polymorphism. **Bone Joint Spine**, 68:378-382, 2001.

BEN-CHETRIT, E.; BRAUTBAR, C.; RUBINOW, A. HLA antigens in Reiter's syndrome in Israeli patients. **J Rheumatol**, 12:964-6, 1985.

BENNETT, P. H.; BURCH, T.A. Population studies of the rheumatic disease. Amsterdam: Excerpta Medica Foundation, 1968, 456-7.

BLANCO-GELAZ, M. A.; LOPEZ-VAZQUEZ, A.; GARCIA-FERNANDEZ, S.; MARTINEZ-BORRA, J.; GONZALEZ, S.; LOPEZ-LARREA C. Genetic variability, molecular evolution, and geographic diversity of HLA-B27. **Hum Immunol**, 62:1042-50, 2001.

BRAUN, J.; BOLLOW, M.; REMLINGER, G. EGGENS, U.; RUDWALEIT, M.; DISTLER, A.; et al. Prevalence of spondyloarthropathies in HLA-B27 positive and negative blood donors. **Arthritis Rheum**, 41:58-67, 1998.

BRAUN-PRADO, K.; VIEIRA MION, A. L.; FARAH PEREIRA, N.; CULPI, L.; PETZL-ERLER, M. L. HLA class I polymorphism, as characterised by PCR-SSOP, in Brazilian exogamic population. **Tissue Antigens**, 58:417-427, 2000.

BREUR-VRIESENDORP, B. S.; DEKKER-SAEYS, A. J.; IVANY, P. Distribution of HLA-B27 subtypes in patients with ankylosing spondylitis: the disease is associated with a common determinant of the various B27 molecules. **Ann Rheum Dis**, 46:353-356, 1987.

BREWERTON, D. A.; HART, F. D.; NICHOLLS, A.; CAFFREY, M.; JAMES, D. C.; STURROCK, R. D.; . Ankylosing spondylitis and HLA-B27. **Lancet**, 1:904-07, 1973.

BROWN, M A.; JEPSON, A.; YOUNG, A.; WHITTLE, H C.; GREENWOOD, B.; WORDSWORTH, B. P. Ankylosin spondylitis in West Africans - evidence for a non-HLA-B27 protective effect. **Ann of the Rheum Diseases**, 56:68-70, 1997.

BROWN, M. A.; PILE, K. D.; KENNEDY, L. G.; CALIN, A.; DARKE, C.; BELL, J.; WORDSWORTH, B. P.; CORNÉLIS, F. HLA class I associations of ankylosing spondylitis in the white population in the United Kingdom. **Ann of the Rheum Diseases**, 1996,55:268-70.

BROWN, M. A.; WORDSWORTH, B. P. Predisposing factors to spondyloarthropathies. **Curr Opin Rheumatol**, 9:308-314, 1997.

BUXTON, S E.; BENJAMIN, R J.; CLAYBERGER, C.; PARHAM, P.; KRENSKY, A M. Anchoring pockets in human histocompatibility complex leukocyte antigen (HLA) class I molecules: analysis of the conserved B ("45") pocket of HLA-B27. **J Exp Med**, 175:809-819, 1992.

BYWATERS, E.G.L. Historical introduction. In: Moll JMH, ed. **Ankylosing spondylitis**. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1980 p 1-15 (apud. ARMAS, 2001).

CALIN, A.; PORTA, J.; FRIES, J. F.; SCHURMAN, D. J. Clinical history as a screening test for ankylosing spondylitis. **JAMA**, 237:261-4, 1977.

CALIN, A. Spondyloarthropathy in Caucasians and Non-Caucasians. **J Rheumtol** 10 (Suppl 10), 16-18, 1983.

CALLEGARI-JACQUES, S. M.; SALZANO, F. M. Brazilian Indian/non-Indian interactions and their effects and their effects. **Cienc Cult**, 51:166-174, 1999.

CARVALHO, A.S. HLA-A, B and C markers in Portuguese population. **Tissue Antigens**, 21:39-44, 1983.

CAVALLI-SFORZA, L. L.; MENOZZI, P.; PIAZZA, A.; eds. The history and geography of human genes. Princeton: Princeton University Press, 1994.

CEDOZ, J. P.; WENDLING, D.; VIEL, J. F. The B7 cross reactive group and spondyloarthropathies: an epidemiological approach. **J Rheumatol**, 22:1884-90, 1995.

CHEN, I.-H.; YANG, K. L.; LEE, A.; HUANG, H. H.; LIN, P. Y & LEE, T. D. Low frequency of HLA-B2706 in Taiwanese patients with ankylosing spondylitis. **Eur J Immunogenetics**, 29:435-38, 2002.

CHOO, S Y.; ANTONELLI, P.; NISPEROS, B.; NEPON, G T.; HANSEN, J A. Six variants of HLA-B27 identified by isoelectric focusing. **Immunogenetics**, 23:24-9, 1986.

CHOU, C.T; PEI, L; CHANG, D.M; LEE, C. F.; SCHUMACHER, H. R.; LIANG, M. H. Prevalence of rheumatic disease in Taiwan: a population-based study of urban, suburban, rural difference. **J Rheumatol**, 21:302-306, 1994.

CRAWFORD, M. H. **The origins of Native Americans evidence from anthropological genetics**. Cambridge: Cambridge University Press, 1998.

CRESSWELL, P. Intracellular surveillance controlling the assembly of MHC class I-peptide complexes. **Traffic**, 1:301-5, 2000.

D'AMATO, M.; FIORILLO, M. T.; CARCASSI, C.; MATHIEU, A.; ZUCCARELLI, A.; BITTI, P. P.; et al. Relevance of residue 116 of HLA-B27 in determining susceptibility to ankylosing spondylitis. **Eur J Immunol**, 25:3199-201, 1995.

DARKE, C.; STREET, J.; HAMMOND, L.; DOWNING, J.; THOMPSON, J. Immunogenetic study of a new HLA allele, B*2723. **Tissue Antigens**, 60:400-403, 2002.

DAUSSET, J. Iso-leuco-autocorps. **Acta Haemat**, 20:156, 1958.

DIVINEY, M; BOYLE, A; CHAPMAN, M; et al. HLA-2723: a new HLA-B*27 allele unreactive with HLA-B27 antisera. Perth: Annual Australian and South East Asian Tissue Typing Association (ASEATTA), 2000 (appud DARKE, 2002)

DOUGADOS, M.; van der LINDEN, S.; JUHLIN, R.; HUITFELDT, B.; AMOR, B.; CALIN, A. et al. The European Spondylarthropathy Study Group preliminary criteria for classification of spondylarthropathy. **Arthritis and Rheumatism**, 34:1218-1227, 1991.

EBRINGER, A.; WILSON, C. HLA molecules, bacteria and autoimmunity. **J Med Microbiol**, 49:305-311, 2000.

eMEDICINE. Disponível em :< [http://:www.emedicine.com](http://www.emedicine.com)>. Acesso em: abril de 2003.

FELDMAN, D.; KEARNS, J.; WU, J.; BASSINGER, S.; MONTOYA, G. D.; McKEEN, M. et al. Identification and sequencing of HLA-B*0714 and B*2718 allele and novel exon 1 sequences of B*0709 and B*2714 alleles in potential bone marrow donors. **Tissue Antigens**, 59:426-29, 2002.

FELDTKELLER, E; LEMMEL, E.M; RUSSEL, A.S. Ankylosing spondylitis in the pharaohs of ancient Egypt. **Rheumatol Int** 23:1-5, 2003.

FELTKAMP, T.E.; KHAN, M. A.; LOPEZ DE CASTRO, J. A.. The pathogenetic role of HLA-B27. **Immunol Today**, 17:5-7, 1996.

FERNÁNDEZ-SUEIRO, J. L: Clinical characteristics and high resolution PCR-SSP typing of HLA-B27 in ankylosing spondylitis patients from Galicia. Comité Ibero-Americano de Reumatologia. Vol.XI, nº 1-2001.

FIORILLO, M. T.; MARAGNO, M.; BUTLER, R.; DUPUIS, L.; SORRENTINO, R. CD8 (+) T-cell autoreactivity to an HLA-B27-restricted self-epitope correlates with ankylosing spondylitis. **J Clin Invest**, 106: 47–53, 2000.

FRAILE, A.; MARTIN, J.; LOPEZ-NEVOT, M. A.; MATARAN, L.; NIETO, A. HLA-B 27 subtyping by PCR-RLFP in Spanish patients with ankylosing spondylitis. **Tissue Antigens**, 52: 492-6, 1998.

GANS, C. P.; MITTON, W.; NG, J.; HARTZMAN, R. J.; HURLEY, C. K. Seven new HLA-B alleles associated with antigens in the B7 CREG. **Tissue Antigens**, 59:229-231, 2002.

- GARCIA-FERNANDEZ, S.; GONZALEZ, S.; MINA BLANCO, A.; MARTINEZ-BORRA, J.; BLANCO-GELAZ, M.; LOPEZ-VAZQUEZ, A. New insights regarding HLA-B27 diversity in the Asian population. **Tissue Antigens**, 58:259-262, 2001.
- GARRET, T. P.; SAPER, M. A.; BJORKMAN, P. J.; STROMINGER, J. L.; WILEY, D.C. Specificity pocketes for the side chains of peptide antigens in HLAw68. **Nature**, 342:692-96, 1989.
- GLADMAN, D. D. Clinical aspects of the spondyloarthropathies. **Am J Med Sci**, 316(4):234-38, 1998.
- GONZALES-ROCES, S.; ALVAREZ, M. V.; GONSALEZ, S.; DIEYE, A.; MAKNI, H.; WOODFIEL, D. G. et al. HLA-B27 polymorfism and worlwide susceptibility to ankylosing spondylitis. **Tissue Antigens**, 49:116-23, 1997.
- GONZÁLES-ROCES, S.; BRAUTBAR, C.; PEÑA, M.; DOMINGUEZ, O.; COTO, E.; ALVAREZ, V.; SEGAL, R.; AND LÓPEZ-LARREA, C. Molecular analysis of HLA-B27 haplotypes in Caucasóides. **Human Immunology**, 41:127-134, 1994.
- GONSALEZ S, GARCIA-FERNANDEZ. S, MARTINEZ-BORRA J, BLANCO-GELAZ MA, RODRIGO L, SANCHES DEL RIO J, et al. High variability of HLA-B27 alleles in ankylosing spondylitis and related spondyloarthropathies in the population of northern Spain. **Hum Immunol**, 63:673-6, 2002.
- GRAHAME W. Is rheumatoid spondylitis a separate entity? **Arthritis Rheum**, 3:88, 1960.
- GRAN, J. T.; HUSBY, G. HLA-B27 and spondyloarthropathy: value for early diagnosis?. **J Med Genet**, 32:497-501, 1995.
- GRUBIC, Z.; KERHIN-BRKLJACIC, V.; PERIC, P.; CECUK-JELICIC, E.; ZUNEC, R AND KASTELAN, A. HLA-B27 subtypes in Croatian patients with ankylosing spondylitis. **Scand J Rheumatol**, 30:51-2, 2001.
- GUIS-SABATIER, S.; NIELSEN, W.; BOETSCH, G.; DUTOUR, O.; MERCIER, P.; REVIRON, D. et al. In Sourthern France, HLA-B*2702 carries susceptibility and HLA-B*2705 carries resistance to ankylosing spondylitis in patients of Spanish and North African descent. **Arthritis Rheum**, 43 (suppl):S266, 2000.

HASEGAWA, T.; OGAWA, A.; SUGAHARA, Y.; MORIYAMA, Y.; NANZAI, H.; TAWARA, K. A novel HLA-B27 allele (B*2711) encoding an antigen reacting with both B27- and B40-specific antisera. **Tissue Antigens**, 49:649-652, 1997.

HEMMATPOUR, S. K.; DUNN, P. P.; EVANS, P. R.; GREEN, A.; HOWELL, W. M. Functional characterization and exon 2-intron 2-exon 3 gene sequence of HLA-B*2712 as found in a British family. **Eur J Immunogenet**, 25:395-402, 1998.

HILL, A. V. S.; ALLSOPP, C. E. M.; KWIATKOWSKI, D.; ANSTEY, N. M.; GREENWOOD, B. M.; MCMICHAEL, A. J.; HLA class I typing by PCR: HLA-B27 and an African B27 subtype. **Lancet**, 337:640-2, 1991.

HUKUDA, S.; MINAMI, M.; SAITO, T.; MITSUI, H.; MATSUI, N.; KOMATSUBARA Y. et al. Spondyloarthropathies in Japan: nationwide questionnaire survey performed by the Japan ankylosing spondylitis Society. **J Rheumatol**, 28:554-9, 2001.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA ESTATÍSTICA. Brasil: **500 anos de povoamento**. Rio de Janeiro, IBGE, 2000.

IMGT/ HLA Sequence Database. Disponível em: < <http://www.athyornolan.com> >. Acesso em: 26 out 2003.

JANEWAY, C A; TRAVERS, P; WALPORT, M; SHLOMCHIK, M. The recognition of antigens (Part II): In Immunobiology – The immune system in the health & disease. Ed. Taylor e Francis (5⁰ edition), 2001. < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books>>. Acesso em: 12 maio 2003.

JARDETZKY, T. S.; LANE, W. S.; ROBINSON R. A.; MADDEN, D. R.; WILEY, D. C. Identification of self peptides bound to purified HLA-B27. **Nature**, 353:326-329, 1991.

JONES, E. Y. MHC class I and class II structures. **Curr Opin Immunol**, 9:75-9, 1997.

KAIPIANEN-SEPPEANEN, O.; AHO, K. Incidence of chronic inflammatory joint diseases in Finland in 1995. **J Rheumatol**, 27:94-100, 2000.

KHAN, M. A.; KUSHNER, I.; BRAUN, W. E. A subgroup of ankylosing spondylitis associated with HLA-B7 in American blacks. **Arthritis Rheum**, 21:528-30, 1978.

KHAN, M. A. Spondyloarthropathies. **Rheum Dis Clin North Am**, 18:1-276, 1992.

KHAN, M.A. HLA-B27 and subtypes in word populations. **Curr Opin Rheumatol**, 7:263-9, 1995.

KHAN MA. Update: the twenty subtypes of HLA-B27. **Curr Opin Rheumatol**, 12:235-238, 2000.

KHAN, M. A. Uptade on Spondyloarthropathies. **American College of Physician-American Society of Internal Medicine**, 136:896-907, 2002a.

KHAN, M. A.; BALL, E.J. Genetic aspects of ankylosing spondylitis. **Best Pract & Res Clin Rheumatol**, 16(4):675-690, 2002b.

KHAN, M. A.; BRAUN, W. E.; KUSHNER, I.; GRECEK, D. E.; MUIR, W. A.; STEINBERG, A. G. HLA-B27 in ankylosing spondylitis: Differences in frequency and relative risk in American Blacks and Caucasians. **J Rheumatol**, 4 (suppl 3):39-43, 1997.

KLEIN, J. Natural history of the Major Histocompatibility Complex. New York: Wiley, 1986.

KRYLOV, M.; ERDESZ, S.; ALEXEEVA, L.; BENEVOLENSKAYA, L.; ARNETT, F. C.; REVEILLE, J. D. HLA class II and HLA-B27 oligotyping in two Siberian native population groups. **Tissue Antigens**, 46:382-6, 1995.

LAU, C. S.; BURGOS-VARGAS, R. LOUTHRENOO, W.; MOK, M. Y.; WORDSWORTH, P.; ZENG, Q. Y. Features of spondyloarthritis around the word. **Rheum Dis Clin North Am**. 24:753-70, 1998.

LIU, R; HE, L; GONG, Y, et al; Epidemiological studies of ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis Yinchuan areas. **Clin J Rheumatol**, 4(suppl 2):25, 2000.

LÓPEZ-LARREA, C.; GONZALEZ-ROCES, S.; PEÑA, M.; DOMINGUES, O.; COTO, E.; ALVAREZ, V, et al. Characterization of B27 haplotypes by oligotyping and genomic sequencing in the Mexican Mestizo population with ankylosing spondylitis: juvenile and adult onset. **Human Immunology**, 43:174-180, 1995a.

LÓPEZ-LARREA, C.; SUJIRACHATO, K.; MEHRA, N. K.; CHIEWSILP, P.; ISARANGKURA, D.; KANGA, U.; DOMINGUES, O.; COTO, E.; PEÑA, M.; SETIÉN, F.; GONZALES-ROCES, S. HLA-B27 subtypes in Asian patients with ankylosing spondylitis. **Tissue Antigens**, 45: 169-176, 1995b.

LOUZADA-Jr, P; SMITH A; HANSEN, JA & DONADI, EA. HLA-DRB1 and HLA-DQB1 alleles in the Brazilian population of the northeastern region of the state of São Paulo. **Tissue Antigens**, 57: 158-162, 2001.

MacLean, L. HLA-B27 subtypes: implications for the spondyloarthropaties. **Ann Rheum Dis**, 51:929-931, 1992.

MARCHIONNI, L.; MODENA, V.; ROGGERO, R.; CURTONI, E. S. The polymorfism of HLA-B27 and the seronegative spondyloarthropaties in the Italian population. [Abstract]. In: Presented at the 13th European Histocompatibility Conference , Crete: European Federation for Immunogenetics, 1999.

MARSH, S.G.E. Nomenclature for factors of the HLA system, uptate October 2000. **Tissue Antigens**, 57:93-4, 2001.

MARTINEZ B, CARABALLO L, HERMANDEZ M, VALLE R, AVILA M, IGLESIAS GAMARRA A: HLA-B27 subypes in patients with ankylosing spondylitis (AS) in Colombia. **Rev Invest Clin**, 51:221-6, 1999.

MASON, P. M.; PARHAM, P. HLA class I region sequences, 1998. **Tissue Antigens**, 51:417-66, 1998.

MATHIEU, A.; SORRENTINO, R. HLA-B*2709 and spondyloarthropathy: Comments on the paper by Olirieri et al. **Arthritis Rheum**, 48(3):866-7, 2003.

MATSUMURA, M.; FREMONT, D. H.; PETERSON, P. A.; WILSON, I. A. Emerging principles for the recognition of peptide antigens by MHC class I molecules. **Science**, 257:927-934, 1992.

MAYER, W. E.; KLEIN, J. Is tapasin a modified MHC class I molecule? **Immunogenetics** 53:719-23, 2001.

NASUTION, A. R.; MARDJUADI, A.; KUNMARTINI, S.; SURYADHANA, N. G.; SETYOHADI, B.; SUDARSONO, D. HLA-B27 subtypes positively and negatively associated with spondyloarthritis. **J Rheumatol**, 24: 1111-4, 1997.

OLERUP, O. HLA-B27 typing by a group-specific PCR amplification. **Tissue Antigens**, 43:253-6, 1994.

OLIVIERI, I.; CIANCO G.; PADULA, A.; GAUDIANO, C.; MASCIANDARO, S.; MORO, L.; et al. The HLA-B*2709 subtypes confers susceptibility to spondyloarthritis. **Arthritis Rheum**, 46:553-4, 2002 a.

OLIVIERI, I.; PADULA A.; CIANCO G.; MORO, L.; DURANTE, E.; GUADIANO, C.; et al. The HLA-B*2709 subtypes in a patient with undifferentiated spondylarthritis. **Ann Rheum Dis**, 59:654-5, 2000.

OLIVIERI, I.; PADULA, A.; PIERO, A.; FAVORO, L.; ORANGER, G. S.; FERRI, S. Late onset undifferentiated seronegative spondyloarthritis. **J Rheumatol**, 22:899-903, 1995.

OLIVIERI, I.; van TUBERGEN, A.; SALVARANI, C.; van der LINDEN, S. Seronegative spondylarthritides. **Best Pract & Res Clin Rheumatol**, 16(5):723-739, 2002 (b).

OROZCO-MEDINA, J.H.; VÁZQUEZ-ESCOBOSA, C. Antígenos HLA en espondilitis anquilosante. **Rev Invest Clin**, 33:369, 1981.

PANNER, E.; CRESSWELL, P. Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing. **Ann Rev Immunol**, 16:323-58, 1998.

RAMOS, M.; ALVAREZ, I.; SESMA, L.; LOGEAN, A.; ROGMAN, D.; LOPEZ DE CASTRO, J.A. Molecular mimicry of an HLA-B27-derived ligand of an arthritis-linked subtypes with chlamydial proteins. **J Biol Chem**, 277: 87573–81, 2002.

RAMOS, M.; LÓPEZ DE CASTRO, J. A. HLA-B27 and the pathogenesis of spondyloarthritis. **Tissue Antigens**, 60:181-205, 2002.

REN, E. C.; KOH, W. H.; SIM, D.; BOEY, M. L.; WEE, G. B.; CHAN, S. H. Possible protective role of HLA-B*2706 for ankylosing spondylitis. **Tissue Antigens**, 49:67-69, 1997.

RESNICK, D.; NIWAYAMA, G. **Ankylosing spondylitis**. In: Resnick D. editor. *Diagnosis of home and joint disorders*. Philadelphia: W.B. Saunders:1008-74, 1995.

REVEILLE, J. D.; HLA-b27 and the seronegative spondyloarthropathies. **Am J Med Sci**, 316:239-249, 1998.

REVEILLE, J. D.; BALL, E. J.; KHAN, M. A. HLA-B27 and genetic predisposing factors in spondyloarthropathies. **Curr Opin Rheumatol**, 13:265- , 2001.

RIVERA, S.; HASSANHI, M.; MÁRQUEZ, G.; FUENMAYOR, A.; MONZÓN, J.; ÁVILA, J. Estudio de la relación existente entre las espondiloartropatías y el antígeno HLA-B27 en pacientes del estado Zulia de Venezuela. **Sangre**, 41 (6): 473-476, 1996.

ROBSON, J; WALLER, M. J.; PARHAM, P.; de GROOT, N.; BONTROP, R.; KENNEDY, L.; *et al.* IMGT/HLA and IMGT/MHC: sequence databases for study of the major histocompatibility complex. **Nucleic Acids Research**, 31 (1) 311-314, 2003.

ROCK, K. L.; GOLDBERGER, A. L. Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-present peptides. **Ann Rev Immunol**, 17:739-79, 1999.

ROVERO, P; RIGANELLI, D; FRUCI, D.; VIGARRO, S.; PEGORARO, S.; REVOLTELLA, R.; *et al.* The importance of secondary anchor residue motifs of HLA class I proteins: a chemometric approach. **Mol Immunol**, 31:549-554, 1994.

SAILLARD, J.; FOSTER, P.; LYNNERUP, N.; BANDELT, H. J.; NORBY, S. mtDNA variation among Greenland Eskimos: The edge of the Beringian expansion. **Am J Hum Genet**, 67:718, 2000.

SAMPAIO-BARROS, P. D.; BERTOLO, M. B.; KRAEMER, M. H. S.; MARQUES NETO, J. F.; SAMARA, A. M. Primary ankylosing spondylitis: Patterns of disease in a Brazilian population of 147 patients. **J Rheumatol**, 28:560-5, 2001a.

SAMPAIO-BARROS, P. D.; BERTOLO, M. B.; KRAEMER, M. H. S.; MARQUES-NETO, J. F.; SAMARA, A. M. Undifferentiated spondyloarthropathies: A 2- year follow-up study. **Clin Rheumatol**, 20:201-206, 2001b.

SAMPAIO-BARROS, P D; CONDE, R.A; DONADI, E. A; KRAEMER, M. H. S; PERSOLI, L; COIMBRA, I. B.; et al. Undifferentiated Spondyloarthropaties Brazilians: Importance of the HLA-27 and the B7-CREG alleles in the characterization and disease progression. **J Rheumatol**, 30:2632-7, 2003.

SAMPAIO-BARROS, P. D. Espondiloartropatias. In: WARD, L; GUARIENTO, M. H. **Medicina ambulatorial do adulto**. São Paulo: Roca (no prelo).

SARAUX, A.; GUEDES, C.; ALLAIN, J.; DEVAUCHELLE, V.; VALLS, I.; LAMOUR, A.; et al. Prevalence of rheumatoid arthritis and spondyloarthropathy in Brittany, France. **J Rheumatol**, 26:2622-2627, 1999.

SCHLOSSTEIN, L.; TERASAKI, P. I.; BLUESTONE, R.; PEARSON, C. High association of HLA antigen, W27, with ankylosing spondylitis. **N Engl J Méd**, 288:704-06, 1973.

SCOFIELD, R. H.; KURIEN, B.; GROSS, T.; WARREN, W. L.; HARLEY, J. B. HLA-B27 binding of peptide from its own sequence and similar peptides from bacteria: implications for spondyloarthropathies. **Lancet**, 345:1542-4, 1995.

SEURYNCK, K.; BAXTER-LOWE, L. A: Novel polymorphism detected in exon 1 of HLA-B*2713. **Tissue Antigens**, 52:187-89, 1998.

SHANKARKUMAR, U.; GHOSH, K.; MOHANTY, D. HLA-B27 polymorphism in Western India. **Tissue Antigens**, 60:98-101, 2002.

STEIN, M.; DAVIS, P.; EMMANUEL, J.; WEST, G. The spondyloarthropathies in Zimbabwe: A clinical and immunologic profile. **J Rheumatol**, 17:1337-9, 1990.

STEINER, N. K.; JONES, P.; KOSMAN, C.; EDSON, S.; RIZZUTO, G.; GANS, C. P. et al. Novel HLA-B alleles associated with antigens in the 7C CREG. **Tissue Antigens**, 57:486-488, 2001.

SU, B.; JIN, L.; UNDERHILL, P.; MARTISON, J.; SAHA, N.; MCGARVEY, S.T.; SHRIVER, et al. Polynesian origins: Insights from the Y chromosome. **Proc Natl Acad Sci**, 97:8225,2000.

SUDARSONO, D.; HADI, S.; MARDJUADI, A.; NASUTION, A. R.; DEKKER-SAEYS, A. J.; BREUR-VRIESENDORP, B. S, et al. Evidence that HLA-B*2706 is not protective against spondyloarthropathy. **J Rheumatol**, 26:1534-6, 1999.

TAMOUSA, R.; MANSOUR, I.; BOUGUACHA, N.; KLAYME, S.; DJOUADI, K.; LAOUSSADI, S. et al. A new HLA-B27 allele (B*2719) identified in a Lebanese patient affected with ankylosing spondylitis. **Tissue Antigens**, 68:30-33, 2001.

TAUROG, J. HLA-B27 subtypes, disease susceptibility, and peptide binding specificity. In: Spondylarthritides. Calin, A, Taurog J. D, editors. Oxford: Oxford University Press; 1998: p. 267-73.

TAROUG J. D. HLA-DR4 and the spondyloarthropathies. **Ann Rheum Dis**, 61:193-4, 2002.

UEHARA, C. B. **Caracterização do gene HLA-B27 e seus subtipos de alelos em pacientes com espondilite anquilosante.** São Paulo, 2001. (Tese de Mestrado – Universidade de São Paulo).

UCHANSKA-ZIEGLER, B.; e ZIEGLER, A. Ankylosing spondylitis: a β_2 m-deposition disease? **Trends in Immunology**, 24 (2) 2003.

van der LINDEN, S. M.; VALKENBURG, H. A.; CATS, A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis: A proposal for modification of the New York criteria. **Arthritis Rheum**, 27:361-8, 1984.

VOORTER, C. E. M.; SWELSEN, W. T. N.; van den BERG-LOONEN. B27 in molecular diagnostics: Impact of new alleles and polymorphism outside exons 2 and 3. **Tissue Antigens**, 60:25-35, 2002.

WRIGHT, V.; MOLL, J. Seronegative polyarthritis. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1976.

YAMAGUCHI, A.; OGAWA, A.; TSUCHIYA, N.; SHIOTA, M.; MITSUI, H.; TOKUNAGA, K.; TADOKORO, K.; JUJI, T. AND ITO, K. HLA-B27 subtypes in Japanese with seronegative spondyloarthropathies and healthy controls. **J Rheumatol**, 23:1189-93, 1996.

YAMAGUCHI, A.; TSUCHIYA, N.; MITSUI, H.; SHIOTA, M.; OGAWA, A.; TOKUNAGA, K.; et al. Association of HLA-B39 with HLA-B27 negative ankylosing spondylitis and pauciarticular juvenile rheumatoid arthritis in Japanese patients. Evidence for the role of the peptide-anchoring B pocket. **Arthritis Rheum**, 38:1672-7, 1995.

9 - ANEXOS

Critérios de Diagnóstico da espondilite anquilosante

Critérios de New York Modificados para EA

Critérios Clínicos:

1. Lombalgia e rigidez por mais de três meses que melhora com exercícios, mas não com repouso.
2. Limitação da mobilidade da coluna lombar nos planos sagital e frontal
3. Limitação da expansão torácica relativamente aos valores normais corrigidos para a idade e sexo

Critérios Radiológicos:

1. Sacroflite grau 2 a 4 bilateral
2. Sacroflite grau 3-4 unilateral

A - Considera-se EA definida se um dos critérios radiológicos está associado com, pelo menos, um critério clínico.

B - A EA é considerada provável se:

- 1) Estão presentes três critérios clínicos
- 2) Se o critério radiológico está presente sem quaisquer sinais ou sintomas que satisfaçam os critérios clínicos

van der LINDEN S. M *et al.*, 1984

VARIAÇÕES NOS AMINOÁCIDOS DOS ALELOS DO HLA-B27

Pockets	variação dos aminoácidos do domínio $\alpha 1$												variação dos aminoácidos do domínio $\alpha 2$										$\alpha 3$			
	L	A	B	B	B	C/F	D	D/E	F	E	E	E	E	E												
Resíduos	-20	59	63	67	69	70	71	74	77	80	81	82	83	94	95	97	103	113	114	116	131	143	152	156	163	211
Subtipos																										
B*2705	ALA	TYR	GLU	CYS	ALA	LYS	ALA	ASP	ASP	THR	LEU	LEU	ARG	THR	LEU	ASN	VAL	TYR	HIS	ASP	SER	THR	VAL	LEU	GLU	ALA
B*2701	-	-	-	-	-	-	-	TYR	ASN	-	ALA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND
B*2702	-	-	-	-	-	-	-	-	ASN	ILE	ALA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B*2703	-	HIS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B*2704	-	-	-	-	-	-	-	-	SER	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	GLU	-	-	GLY
B*2706	-	-	-	-	-	-	-	-	SER	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ASP	TYR	-	-	GLU	-	-	GLY
B*2707	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	SER	-	HIS	ASN	TYR	ARG	-	-	-	-	-
B*2708	-	-	-	-	-	-	-	-	SER	ASN	-	ARG	GLY	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B*2709	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	HIS	-	-	-	-	-	-
B*2710	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	GLU	-	-	ND
B*2711	-	-	-	-	-	-	-	-	SER	-	-	-	-	-	-	SER	-	HIS	ASN	TYR	ARG	-	-	-	-	-
B*2712	-	-	-	-	THR	ASN	THR	-	SER	ASN	-	ARG	GLY	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B*2713	GLU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B*2714	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	TRP	THR	LEU	-	-	-	-	-	-	-	-	ND
B*2715	-	-	-	-	-	-	-	-	SER	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	GLU	-	THR	ND
B*2716	-	-	-	-	THR	ASN	THR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND
B*2717	-	PHE	-	SER	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND
B*2718	-	-	-	-	THR	ASN	THR	TYR	SER	ASN	-	ARG	GLY	-	-	-	-	-	-	-	-	-	GLU	-	-	ND
B*2719	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ILE	ILE	ARG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND
B*2720	-	-	-	-	-	-	-	-	SER	-	-	-	-	-	-	-	-	HIS	ASN	TYR	ARG	-	GLU	-	-	ND
B*2721	-	-	-	-	-	-	-	-	SER	-	-	-	-	-	-	ARG	-	-	ASP	TYR	-	-	GLU	-	-	ND
B*2722	-	-	-	-	-	-	-	-	SER	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ASP	TYR	-	-	GLU	-	-	GLY
B*2723	-	-	ASN	PHE	THR	ASN	THR	TYR	SER	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND
B*2724	-	-	-	-	-	-	-	-	SER	-	-	-	-	-	-	SER	-	HIS	ASN	TYR	ARG	SER	GLU	-	-	ND
B*2725	-	-	-	-	-	-	-	-	SER	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	GLU	TRP	THR	ND

HLA-B*2722 foi deletado oficialmente como um dos subtipos do HLA-B27 pela Organização Mundial de Saúde em 02 de abril de 2002. (KHAN, 2002b)

Adaptada e modificada: BLANCO-GELAZ, 2001; RAMOS, 2002